

DEBRECENI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG-, ÉLELMISZERTUDOMÁNYI ÉS
KÖRNYEZETGAZDÁLKODÁSI KAR
KERTÉSZETTUDOMÁNYI INTÉZET

Agrobiotechnológia

Egyetemi jegyzet



DEBRECENI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG-, ÉLELMISZERTUDOMÁNYI ÉS
KÖRNYEZETGAZDÁLKODÁSI KAR

AGROBIOTECHNOLÓGIA

Egyetemi jegyzet



Debreceni Egyetemi Kiadó
Debrecen University Press
2014

Írták:
DR. PEPÓ PÁL egyetemi tanár
DR. BÓDI ZOLTÁN
KOVÁCS ANDRÁS
KOVÁCSNÉ OSKOLÁS HENRIETT

Lektorálta:
DR. KRUPPA JÓZSEF tb egyetemi docens



Kiadta a Debreceni Egyetemi Kiadó Debrecen University Press
Felelős kiadó: Karácsony Gyöngyi

Előszó

A Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrumában a szántóföldi növények genetikájának, nemesítésének oktatása régi múltra tekint vissza. Az említett diszciplínák egyetemi szintű ismerete nélkülözhetetlen a Mezőgazdaságtudomány-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar valamint a Gazdálkodástudományi és Vidékfejlesztési Kar hallgatóinak. A gyakorlati jegyzet összeállítása során figyelembe vettük a különböző diszciplínák (molekuláris biológia, genetika, biotechnológia) gyors fejlődése során létrejött legújabb ismereteket. Alapvető célunk megvalósítására átfogó, tömör megfogalmazásokat, ábrákat, naprakész gyakorlatias ismeretanyag közlését tartottuk szükségesnek. A gyakorlati jegyzet különböző képzésekben, különböző tantárgyi címek alatt és különböző mélységekben kerül bevezetésre a tantervekbe.

Reményeink szerint az egyetemi jegyzet hozzásegíti a hallgatóinkat az említett diszciplínák ismereteinek mély és tartós elsajátításához, továbbá a diploma megszerzését követően kellő szakmai ismereteket nyújt számukra.

Debrecen, 2013. október

A szerzők

Tartalomjegyzék

1. Alapfogalmak.....	6
2. Genetikai változatosság szerepe.....	6
3. Kromoszóma vizsgálatok.....	8
4. A genetikai polimorfizmus alapjai.....	11
4.1. Morfológiai jellemzők alapján.....	11
Az előbbi táblázat 11. tulajdonságának részletezett leírása (CPVO TP2/2 szerint).....	17
11. Tulajdonság.....	17
Címer: a főtengeley és az oldalágak közötti szög (a címer alsó harmadában vizsgálva).....	17
4.2. Biokémiai markerek segítségével.....	18
4.3. Genotípus szint, DNS markerekkel.....	19
5. Rekombináns DNS technika.....	26
5.1. DNS elektroforézis.....	26
5.2. Restrikciós endonukleázok.....	27
5.3. Polimeráz láncreakció.....	28
5.4. Rekombináns DNS technika.....	29
5.5. Nukleinsav hibridizáció.....	31
5.6. DNS klónozás plazmidvektorokba.....	32
6. Genetikailag módosított szervezetek létrehozása, mezőgazdasági alkalmazása.....	33
6.1. Genetikailag módosított növények és előfordulásuk.....	42
7. Búza (<i>Triticum aestivum</i> L.) agrobiotechnológia.....	44
7.1. A búza tulajdonságainak megváltoztatására szolgáló új eljárások.....	44
7.2. A minőségi tulajdonságok megváltoztatása a búzában.....	47
8. Kukorica (<i>Zea mays</i> L.) agrobiotechnológia.....	49
8.1. A kukorica genetikai bázisa.....	49
8.2. A kukorica növekedése, fejlődése, kombinálódóképessége.....	52
8.3. A biotikus stresszekkel szembeni tolerancia/rezisztencia.....	57
8.4. A kukorica hibridek műtrágya és növényszám reakciója.....	60
8.5. A kukorica minőségének szerepe, jelentősége és megváltoztathatósága.....	62
8.6. <i>In vitro</i> és konvencionális eljárások integrációja a kukoricánál.....	67
9. Felhasznált és ajánlott irodalom.....	76
10. Melléklet.....	83

1. Alapfogalmak

DNS (dezoxiribonukleinsav): az élet információjának a hordozója. Dezoxiribonukleotidokból felépülő polimer. Elsődleges szerkezete két komplementer fonalból áll. Másodlagos szerkezete egymáshoz csavarodó kettős helix.

DNS fragment: restrikciós emésztéssel vagy PCR alapú eljárásokkal nyert DNS darabok.

DNS–szekvenálás: A DNS bázissorrendjének (nukleotidsorrendjének) meghatározása.

Fenotípus: Az egyed megjelenési formája (külső és belső tulajdonságok), amely a genotípus és a környezeti tényezők kölcsönhatásának eredményeként jön létre.

Genom: egy élőlény, sejt vagy szervezet teljes nukleinsav készlete.

Genomika: a nukleinsavak nukleotid szekvenciájával, az abban kódolt génekkel és azok működésével foglalkozó tudomány.

Genotípus: Egy sejt vagy szervezet genetikai információjának összessége.

Génerózió: A genetikai variabilitás beszűkülése, adott génlokuszhoz tartozó allélek számának csökkenése.

In situ: Természetes körülmények között. (génmegőrzés, szántóföldi próba)

In vitro: Élő szervezeten kívüli; laboratóriumi feltételek mellett.

In vivo: Élő szervezetben, sejtben.

Továbbá: lásd: HESZKY, 2003; HOFFMANN, 2003. az ajánlott irodalomban.

Minden élőlény működéséhez szükséges információt, az élőlény genetikai anyaga a DNS (RNS) tartalmazza. A genetikai anyagukban kódolt információk határozzák meg a növények és az állatok teljesítőképességét, legyen az mennyiségi (terméshozam, stb.) vagy minőségi (pl. fehérjetartalom) tulajdonság.

2. Genetikai változatosság szerepe

A növénytenyésztés sikerét, a kedvezőbb genetikai struktúrájú fajták előállítását jelentős mértékben befolyásolja a rendelkezésre álló alapanyagok mennyisége és genetikai gazdagsága. A hibridkukoricák térhódítása nyomán a köztermesztésből a szabadlevirágzású fajták, tájfajták – melyek a génkészletük gazdagsága miatt mindig

biztos alapot jelentettek a növénynemesítés számára – teljesen kiszorultak. Annak ellenére, hogy megmentésükre történtek lépések, mégis sok anyag megsemmisült és a génkészletek leszűkültek. Emiatt keressük azokat a lehetőségeket, melyek az alapanyagbázis növelését, a génkészletek gazdagítását elősegíthetik.

A biodiverzitás képezi az alapját az ember által felhasznált élelmiszereknek, rost- és ipari növényeknek és a napjainkban termesztett növényeknek, ugyanakkor szabályozza a Föld létezésének feltételeit és nem utolsósorban esztétikai értéket képvisel.

A nemesítő csak széles genetikai bázisból tud sikeresen, számára kedvező genotípusokat kiválogatni és a további munkájában felhasználni. A genetikailag eltérő kukorica hibridek előállítása termesztésük kockázatának csökkentését is jelentheti, hiszen jobb adaptációs képességgel fognak bírni a különböző termőhelyi és időjárási viszonyokhoz. Az utóbbi évtizedekben mind Európában mind Amerikában erősen lecsökkent a kiinduló szülői vonalak száma. Kialakult egy kevés törzsből álló jó kombinálódó-képességgel bíró, nagy heterózist nyújtó vonaltenyészet. Az ezekből származó hibridek nagyfokú genetikai hasonlósága sebezhetővé teheti őket a különféle abiotikus és biotikus stressz-faktorokkal szemben.

A genetikai homogenitás növekedése a biológiai háttér oldaláról a termésnövekedés akadályozójává vált, mert a hibridek ökológiai érzékenysége nagymértékben fokozódott. A növénynemesítés tőkeigénye világszerte rohamosan nő, a nagy konkurencia miatt felgyorsult a koncentráció, ami a genetikai variabilitás beszűküléséhez vezethet.

A fajok, fajták változatosságának fennmaradása jelentheti a jövőbeli nemesítési és szelekciós munka, a változó körülményekhez és igényekhez alkalmazkodó új fajták létrehozásának az alapját. A géntechnológia térnyerésének (GMO) legnagyobb kockázata, hogy a mezőgazdaságot még tovább uniformizálja.

A GM növényeknek a biodiverzításra nemcsak negatív, hanem pozitív hatásuk is lehet. A géntechnológia alkalmazása nem mindig a géneróziót növeli, hanem olyan

fajokat is létrehozhat, amelyek addig nem fordultak elő a természetben, hozzájárulva ezáltal a biodiverzitás növeléséhez. Ha a fajon belüli populációk, a faj genetikai sokszínűsége csökken, ún. génerózió következik be. A csökkent változatosságú faj a változó környezethez való alkalmazkodásában hátrányos helyzetbe kerül.

Napjainkban megfigyelhető a fajták vélt vagy valós hasonlósága, a génerózió és az az igény, hogy a termelők kevesebb fajta vetésével homogén minőségű árut állítsanak elő.

A FAO 1996-os adatai szerint, a Mexikóból származó kukoricafajták mintegy 20 %-a tűnt el az 1930-as évek óta. Az USA-ban a 20. század elején termesztett kukoricafajták 91 %-a szintén eltűnt és a mai termesztés kevesebb, mint 10 hibridre épül.

Az utóbbi néhány évtizedben a kukoricanemesítés szűk genetikai bázisra épült, mely magában hordozza a genetikai diverzitás csökkenésének a veszélyét és korlátozhatja a genetikailag eltérő szülők közötti keresztezés lehetőségét. Ez a múltban, de napjainkban is számos problémát vethet fel, így elsősorban a hibrid betegségekkel szembeni ellenálló-képességének, az alkalmazkodó-képességének a csökkenését.

3. Kromoszóma vizsgálatok

A kromoszómák a növényi vagy állati szövetek osztódásban levő sejtjeinek metszeteiben vizsgálhatók eredményesen (1–3. ábra).

A kromoszómák vizsgálatára igen alkalmasak a növényi merisztémából, pollen anyasejtekből, nyálmirigyekből stb. vett biológiai anyagok. Magfestékekkel (pl. kármin) könnyen megfesthetők, DNS tartamuknál fogva pedig Feulgen-reakció útján jól kimutathatók.

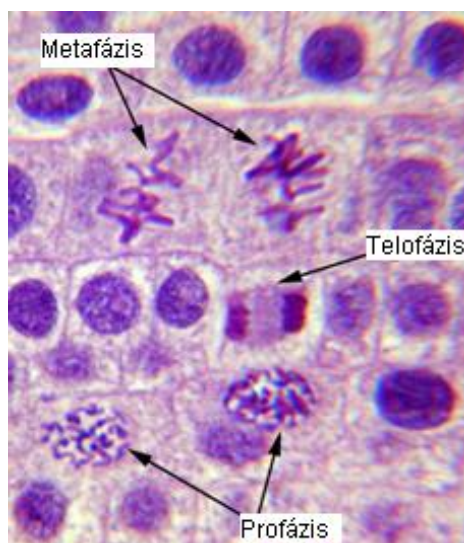
A mitózis tanulmányozása

1. preparátum készítése
2. az osztódó sejtek megszámlálása egy adott látótérben
3. az osztódási fázisok azonosítása

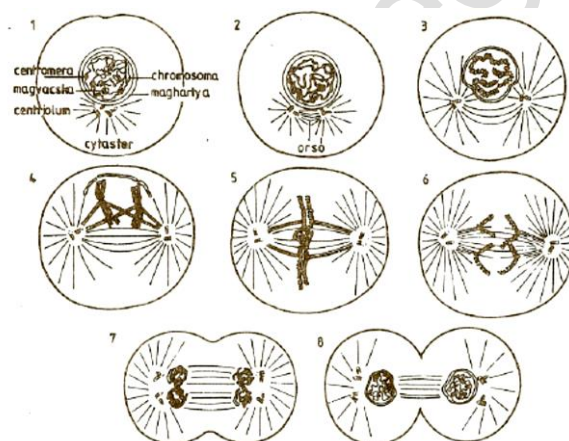
4. kromoszóma számlálás meta- és anafázis esetén.

Preparátum készítés

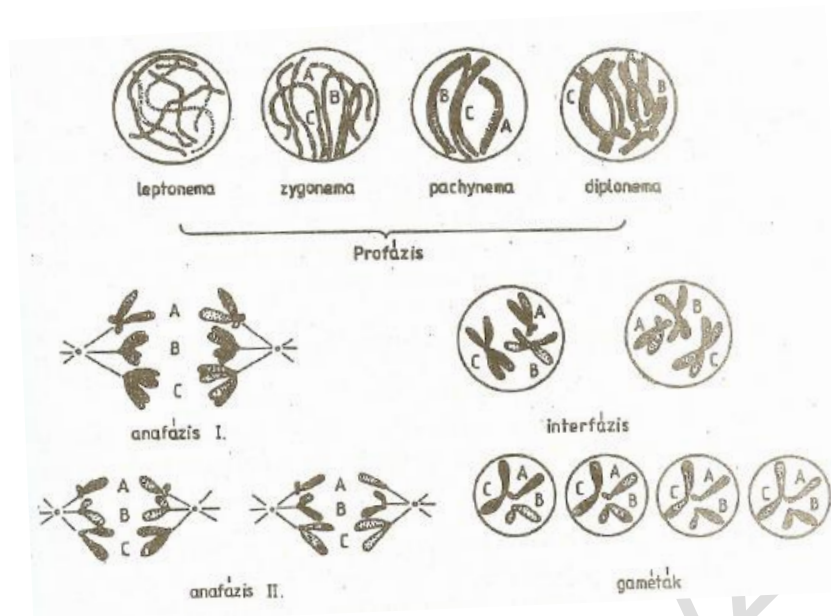
- a). 2–3 mm-i gyökércsúcs levágása szikével, előcsíráztatott hagyma vagy más csíranövény gyökeréről
- b). A gyökércsúcs rögzítése Carnoy II. oldatban óraüvegen. Rögzítési idő 5 perc. (jégecet:absz. alkohol 1:3 arányban)
- c). Macerálás (5 perc). Célja, hogy a gyökércsúcs áttetsző legyen. A pektint kioldja, a szövet sejtekre esik szét. (sósav, alkohol=1:1)
- d). Desztillált vizes kimosás: 2–3 szor megmártjuk a gyökércsúcsokat.
- e). Chamberlain pácos kezelés 2–3 percig (fehérjék kicsapása, összetétel: formalin, alkohol, desztillált víz)
- f). Utólagos rögzítés Carnoy II. oldatban 2–3 percig
- g). Festés: a gyökércsúcsot tárgylemezre helyezzük, hozzáadunk 1 csepp karmin–ecetsavat. Hidegen lefedjük és szét nyomjuk vagy előzőleg gyengén melegítjük, amíg a festék széle bekoncentrálódik. Hideg lefedés esetén ezután végezzük a melegítést. Ezután a preparátumot szét nyomjuk úgy, hogy egysejtsorúvá telítődjön.
- h). Schmidt elzáróval a preparátumot a fedőlemez egyik oldaláról elzárjuk. Az elzáró folyadék áramlásba kezd és a meg nem kötött karmint kiviszi a fedőlemez alól, így tiszta preparátumot nyerünk. (Összetétel: desztillált víz, glicerin, gumiarabicum, chlorálhidrát.)
- i). Vizsgálat: 200–szoros nagyítással az osztódó sejtek kikeresése interfázisban levő sejtek közül. A nagyítás növelése esetén immerziós olajat használunk.



1. ábra. Különböző osztódási fázisok a hagyma (*Allium cepa*) gyökércsúcsából készített preparátumon 200-szoros nagyítást alkalmazva
(www.dgci.sote.hu/file.download.php?id=771 nyomán)



2. ábra. Két kromoszómájú ideális sejt mitózisának sémája: 1–3 profázis, 4 prometafázis, 5 metafázis, 6 anafázis, 7–8 telofázis. (PEPÓ, 1985 nyomán).



3. ábra. A meiózis általános sémája (PEPÓ, 1985 nyomán).

4. A genetikai polimorfizmus alapjai

A kiindulási nemesítési alapanyagok genetikai háttérének ismeretében törekedhetünk a produktivitás, az alkalmazkodóképesség, a minőség és a genetikai diverzitás egyidejű növelésére, a genetikai sebezhetőség minimalizálására. A genetikai különbség megállapításában a morfológiai (DUS bélyegek) vizsgálati módszer mellett a molekuláris genetikai markerek alkalmazása is segítséget nyújthat. A növénynemesítésben használatos molekuláris markerezésre alapozott azonosítási technikák (izoenzim, RFLP, RAPD, stb.) döntően a nemesítési alapanyag genetikai változékonyságát és annak mértékét, a heterózis mértékének előrejelzését, fajtavédelmi kérdések tisztázását segítheti elő.

Fajok, fajták elkülönítése, csoportosítása, csoportokba sorolása többféle módszer alapján valósítható meg.

4.1. Morfológiai jellemzők alapján

Morfológiai jellemzők DUS leírás (1. táblázat) vagy színmarkerek (gyökér antociánosság, CHASE féle markergénés módszer) alapján.

A növényfajták megkülönböztethetőségi (Distinctness), az egyöntetűségi (Uniformity) és az állandósági (Stability) (DUS) tesztelését morfológiai és fenotípusos jellemzők

alapján végzik. A DUS–vizsgálatokban egyes fajoknál speciális feltételek, igények jelentkeznek. Így van ez a kukorica esetében is, melynél a vizsgálati anyag nagysága és heterogenitása jelent külön gondot.

A Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal (2007. jan. 1–től) jogelődjénél az Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézetben (OMMI) a szántóföldi növényfajták állami elismeréséhez és szabadalmazásához szükséges ún. DUS–vizsgálatok körében – méretét tekintve – a legjelentősebb növényfaj a kukorica. A vizsgálandó anyagot (kukorica) az OMMI kísérletekben két helyen, Tordason és Debrecenben állítják be azonos módon.

A DUS–vizsgálat négy területre oszlik: a megkülönböztetethezősége, a homogenitásra (egyneműség), az állandóságra (stabilitásra) és a fajtaleírásra.

A morfológiai jellemzők használata nagyon korlátozott a fajtaleírásoknál és ismételthezősége is bizonytalan, hiszen nagyban befolyásolhatják a genetikai kapcsolat érvényre jutását a környezeti tényezők.

A DUS–vizsgálatok eredményeként kapott fajtaleírások segítségével a leghasonlóbb fajta meghatározása illetve a hasonlósági csoportok vizsgálata is lehetségesé válik. Ugyanezen szerzők megállapítják, hogy a fajtaoltalmi jog alakulása és a biotechnológia fejlődése, a „lényegében származtatott fajta” fogalmának megjelenése a hasonlósági vizsgálatok egyre nagyobb szerepét vetíti elő a jövőben.

VERESS és LÁZÁR (1997) dolgozatukban kiemelik, hogy vizsgálataik során (OMMI kísérlet) a legfontosabb terület a megkülönböztetethezőség megállapítása, amely erősen függ a figyelembe vett tulajdonság jellegétől. A DUS–megkülönböztetethezőségi vizsgálatok a tulajdonságonkénti fajta–összehasonlíthatásra épülnek. Ha bármelyik vizsgált tulajdonságra a vizsgált fajtapár világosan és következetesen eltérő, akkor a két fajta egymástól megkülönböztetethező.

CPVO TP2/2 jelentése: Community Plant Variety Office Technical Protocol

Közösségi Fajtaoltalmi Hivatal vizsgálati irányelv

Interneten: www.cpvo.europa.eu/index800.php

1. táblázat. Tulajdonságtáblázat a DUS és a fajtaleíráshoz, kiragadott példa a kukorica CPVO TP2/2 vizsgálati irányelvéből

CPVO szám	UPOV szám	Tulajdonság	Stádium ¹	Kifejeződési fokozat	Példa- fajták	Kód
1.	1.	Első levél: a levélhüvely antoci- ános színeződése	12–14 (S) ²	hiányzik v. nagyon gyenge gyenge közepes erős nagyon erős	F 113 F 2 F 244	1 3 5 7 9
2. (+) ³	2. (+) ³	Első levél: a csúcs formája	14	hegyes hegyestől a lekerekítettig lekerekített lekerekítettől a tompáig tompáig	W 117 F 2 EP 1	1 2 3 4 5
3. (+) H ⁴	3. (+)	Levél: a levéllemez és a szár által bezárt szög (közvetlenül a legfelső jól fejlett csó felett)	65–71	nagyon kicsi kicsi közepes nagy nagyon nagy	 W 117 F 252	1 3 5 7 9
4. (+) H	4. (+)	Levél: a levéllemez állása (u.a. mint a 3.)	65–71	egyenes kissé görbe görbe erősen görbe nagyon erősen görbe	F 252 F 1444 F 186 CM 7	1 3 5 7 9
5. H	6.	Szár: a harmatgyökerek antociá- nos színeződése	65–75 (S)	hiányzik v. nagyon gyenge gyenge közepes erős nagyon erős	W 182 E F 7 F 2 A 632	1 3 5 7 9
6. H	7.	Címer: hímvirágzás időpontja (a főtenyely középső harmadában, a növények 50 %-án)	65	nagyon korai nagyon koraitól koraiig korai koraitól közepesig közepes közepestől későiig késői későitől nagyon későiig nagyon késői	KW 1069 F 7 F 259 W 117 A 632 M 017 B 73	1 2 3 4 5 6 7 8 9

CPVO szám	UPOV szám	Tulajdonság	Stádium ¹	Kifejeződési fokozat	Példa- fajták	Kód
7. (+) H	8. (+)	Címer: a kalászkapelyva alapjá- nak antociános színeződése (a fő- tengely középső harmadában)	65 (S)	hiányzik v. nagyon gyenge gyenge közepes erős nagyon erős	W 117 F 2 F 107 EP 1	1 3 5 7 9
8. H	9.	Címer: a kalászkapelyva antoci- ános színeződése az alap nélkül (u.a. mint a 7.)	65 (S)	hiányzik v. nagyon gyenge gyenge közepes erős nagyon erős	F 16 F 2 EP 1 W 79 A	1 3 5 7 9
9.	10.	Címer: a portok angociános szí- neződése (u.a. mint a 7., friss por- tokon)	65 (S)	hiányzik v. nagyon gyenge gyenge közepes erős nagyon erős	F 244 F 2 W 182 E F 195	1 3 5 7 9
10.	11.	Címer: a főtenyél kalászkáinak tömöttsége (u.a. mint a 7.)	69	laza közepes tömött	F 16 W 401 EP 1	3 5 7
11. (+) H	12. (+)	Címer: a főtenyél és az oldalágak közötti szög (a címer alsó harma- dában vizsgálva)	65	nagyon kicsi kicsi közepes nagy nagyon nagy	F 257 EP 1 W 117	1 3 5 7 9
12. (+) H	13. (+)	Címer: az oldalágak állása (u.a. mint a 11.)	65 (S)	egyenes kissé görbe görbe erősen görbe nagyon erősen görbe	F 257 A 619 CM 7 W 117	1 3 5 7 9
13. H	14.	Címer: az elsőrendű elágazások száma	65	hiányzik v. nagyon kevés kevés közepes sok nagyon sok	F 7 F 252 F 244	1 3 5 7 9
14. H	15.	Cső: a bibe megjelenésének idő- pontja (a növények 50 %-án)	65	nagyon korai nagyon koraitól koraiig korai koraitól közepesig közepes közepestől későiig késői későitől nagyon későiig nagyon késői	F 7 F 259 W 117 A 632 M 017 B 73	1 2 3 4 5 6 7 8 9

CPVO szám	UPOV szám	Tulajdonság	Stádium ¹	Kifejeződési fokozat	Példa- fajták	Kód
15. H	16.	Cső: a bibe antociános színeződése	65 (S)	hiányzik jelen van	F 7 F 2	1 9
16. H	17.	Cső: a bibe antociános színeződésé- nek intenzitása	65 (S)	nagyon gyenge gyenge közepes erős nagyon erős	CM 105 F 186 W 401	1 3 5 7 9
17. H	18.	Levél: a levélhüvely antociános színeződése (a növény közepén)	671 (S)	hiányzik v. nagyon gyenge gyenge közepes erős nagyon erős	F 7 F 186 F 195 EP 1	1 3 5 7 9
18.	19.	Címer: a legalsó oldalág feletti főtengely hossza	71	nagyon rövid rövid közepes hosszú nagyon hosszú	EP 1 F 244 F 16	1 3 5 7 9
19. H	20.	Címer: a legfelső oldalág feletti főtengely hossza	71	nagyon rövid rövid közepes hosszú nagyon hosszú	EP 1 F 259 F 16	1 3 5 7 9
20.	21.	Címer: az oldalágak hossza (a leg- hosszabb oldalág hossza a címer alsó harmadában vizsgálva)	71	nagyon rövid rövid közepes hosszú nagyon hosszú	KW 1332 F 2 Rantzo Diaman t	1 3 5 7 9
21.1.	22.1	<u>Csak vonalak</u> Növény: magasság (a címerrel együtt)	75	nagyon alacsony alacsony közepes magas nagyon magas	F 7 W 117 W 182 E M 017	1 3 5 7 9
21.2. H	22.2	<u>Csak hibridek és szabad elvirágzású</u> <u>fajták</u> Növény: magasság (a címerrel együtt)	75	nagyon alacsony alacsony közepes magas nagyon magas	Nano- Dos DK 232 Magiste r Cecilia Alimare	1 3 5 7 9
22. H	23.	Növény: a főcsőeredés magasságá- nak viszonya a növénymagassághoz	75	nagyon kicsi kicsi közepes	F 259 F 522	1 3 5

		nagy	A 632	7
		nagyon nagy		9

CPVO szám	UPOV szám	Tulajdonság	Stádium ¹	Kifejeződési fokozat	Példafajták	Kód
23.	24.	Levél: a levéllemez szélessége (a legfelső jól fejlett csónél)	75	nagyon keskeny keskeny közepes széles nagyon széles	F 16 A 632 W 182 E	1 3 5 7 9
24. H	25.	Cső: a csőkocsány hossza	85	nagyon rövid rövid közepes hosszú nagyon hosszú	F 7 W 582 E F 492	1 3 5 7 9
25. H	26.	Cső: hossza (a csuhé nélkül)	92	nagyon rövid rövid közepes hosszú nagyon hosszú	F 2 A 654 CM 7	1 3 5 7 9
26.	27.	Cső: vastagsága (a középső részén)	92	nagyon vékony vékony közepes vastag nagyon vastag	F 7 W 401 B 73	1 3 5 7 9
27.	28.	Cső: alak	92	kúpos kúpos – hengeres hengeres	F 16 F 7 F 66	1 2 3
28. H	29.	Cső: a szemsorok száma	92	nagyon kevés kevés közepes sok nagyon sok	F 2 EP 1 B 73	1 3 5 7 9
29. H	30.	Cső: szemtípus (a cső középső har- madában)	92 (S)	simaszemű simaszeműhöz hasonló közbenső típus lófogúhoz hasonló lófogú csemege pattogató	F 2 F 252 CO 125 F 259 W 401 Jubilee Iowa Pop	1 2 3 4 5 6 7
30. H	31.	Cső: a szemkorona színe	92 (S)	fehér fehéres sárga sárga sárgás narancs narancs	A 188 W 401 F 2 F 257	1 2 3 4 5

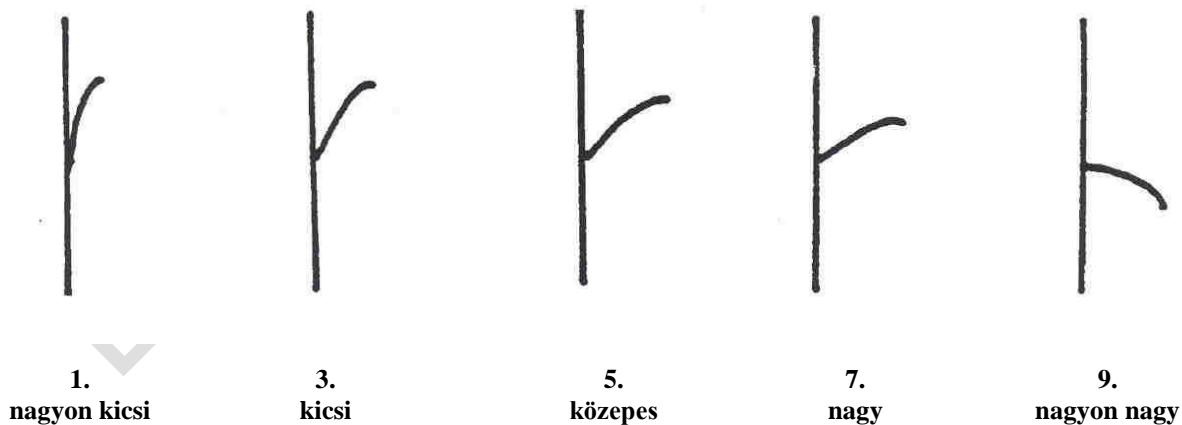
vöröses narancs	6
vörös	7
sötétvörös	8
kékesfekete	9

CPVO szám	UPOV szám	Tulajdonság	Stádium ¹	Kifejeződési fokozat	Példafajták	Kód
31.	32.	Cső: a szem hátoldalának színe	92 (S)	fehér fehéressárga sárga sárgásnarancs narancs vörösesnarancs vörös sötétvörös kékesfekete	F 481 A 188 A 654 F 2 F 7	1 2 3 4 5 6 7 8 9
32. H	33.	Cső: a csutka antociános színező- dése	93 (S)	hiányzik jelen van	F 2 W 117	1 9
33.	34.	Cső: a csuka antociános színező- désének intenzitása	93 (S)	nagyon gyenge gyenge közepes erős nagyon erős	Dea, Prisma Pianosa Alios	1 3 5 7 9

Az előbbi táblázat 11. tulajdonságának részletezett leírása (CPVO TP2/2 szerint)

11. Tulajdonság

Címer: a főtengely és az oldalágak közötti szög (a címer alsó harmadában vizsgálva)



4.2. Biokémiai markerek segítségével

A biokémiai markerek magukban foglalják a különböző tartalékfehérjék, fenolszármazékok, alkaloidok, zsírok, zsírsavak jellemzőit, melyekkel szintén történhet az egyes vizsgálandó fajták elválasztása.

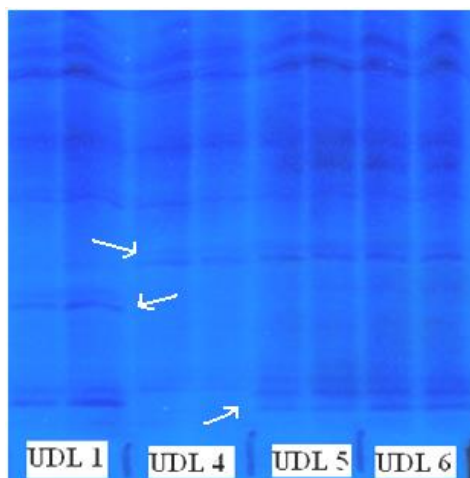
A tartalék fehérje mintázatok jelentősége a polimorfizmus vizsgálatokban

A kukoricaszem alap tartalékfehérjei a prolaminok (zein). A zeint 1821-ben fedezte fel és írta le Gorham. A zein az endospermium fehérjéinek átlagosan 44–79 %-át alkotja, mely értékek függenek a kukorica fajtájától és a szétválasztási módszertől.

A zeineket oldhatóságuk alapján négy típusra (α , β , γ és δ) lehet osztani (ESEN, 1987). A legnagyobb részét a kukorica prolaminjainak az α -zein teszi ki, amely az összes zein kb. 70 %-a. Több szerző (WILSON, 1985; SMITH és SMITH, 1988) használta az α -zein heterogenitását a kukorica genotípusok azonosítására. WILSON és mtsai (1989) izoelektromos fókuszálást (IEF) használt a zein gének azonosítására és talált két kapcsoltsági csoportot a 4-es kromoszómán és egyet a 7-es kromoszómán.

NESZMÉLYI (1997) izoelektromos fókuszálással (IEF) vizsgált különféle hibrideket és szülői vonalait a genetikai tisztaságuk megállapítására. Az IEF a szemben található tartalékfehérje (zein) poliakrilamid-gélen történő szétválasztásán alapszik. A fehérjék extrakció, elektromos mezőben történő szétválasztás, fixálás és festés után határozott sávok formájában láthatók, kapott mintázatuk segítségével faj- és fajtaazonosságuk megállapítható.

Mivel a zein mintázatot a környezeti tényezők nem befolyásolják, a zein-polimorfizmussal beltenyésztett kukoricavonalak és -hibridek genetikai azonosságát vagy különbözőségét lehet kimutatni.



4. ábra. Négy beltenyésztett kukoricavonal (*UDL 1,4,5,6*) zein mintázata poliakrilamid–gélen történő szétválasztást követően. Az egyes vonalakban eltérő zein mintázatot nyilakkal jelöltük.

A 4. ábrán látható négy beltenyésztett kukoricavonal zein mintázata. A zein tartalékfehérjék 5–15 sávot eredményeznek genotípustól függően. A nyilak jelzik a vonalak közötti különbségeket. A sávok mennyiségéből, az egyes genotípusok sávmintázatából hasonlósági koefficiens, genetikai távolságot tudunk számolni (lásd később). Az izoelektromos fókuszálás elvéről, módszeréről részletesen a függelékben.

4.3. Genotípus szint, DNS markerekkel

Molekuláris markerekkel a genotípusokat DNS szinten lehet összehasonlítani.

Az első DNS szintű, de nem a PCR technikán alapuló marker a restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus (RFLP) volt (80–as évek). Hibridizáción alapuló módszer, a molekuláris polimorfizmust a restrikciós enzimekkel véletlenszerűen elvágott genomiális DNS fragmentumok hosszúsági különbözősége adja. Az RFLP hátránya miatt (megfelelő szakmai rutin, radioaktív vizsgálatok, hosszú idő, költség) miatt a PCR alapú technikák irányába fordultak a kutatások a 80–as évek végén. A DNS diagnosztikai módszereket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat. A DNS diagnosztika módszerei (HESZKY és GALLI, 2006 nyomán)

RAPD	AFLP	RFLP
------	------	------

Random amplifikált DNS fragmentum polimorfizmus ↓ primer kötőhely eltérései	Amplifikált fragmentum hosszúság polimorfizmus ↓ hasítási hely és primer kötőhely eltérései	Restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus ↓ hasítási hely eltérései
DNS izolálás		
Teljes genom egyes szakaszainak szelektív (primer) felszaporítása (PCR)	Teljes genom feldarabolása restrikciós enzimekkel fragmentumokra	Teljes genom feldarabolása restrikciós enzimekkel fragmentumokra
	Fragmentumok szelektív felszaporítása (PCR)	Fragmentumok elválasztása (elektroforézissel)
↓	↓	↓
Felszaporított fragmentumok elválasztása (elektroforézis)	Felszaporított fragmentumok elválasztása (elektroforézis)	Szelektív jelölés DNS próbával (DNS hibridizáció)
↓	↓	↓
festés	festés	festés, autoradiográfia
↓	↓	↓
értékelés	értékelés	értékelés

RFLP (restriction fragment length polymorphism)

1974 Grodzicker és mtsai: adenovírus DNS hasítása endonukleázokkal.

1978 Kan és Dozy, Botstein és mtsai: a különböző hosszúságú fragmentek felhasználása genetikai kapcsoltsági térkép készítésére.

Módszer:

- DNS extrakció (csíranövény friss levelekből)
- DNS emésztése restrikciós endonukleázokkal

- Agaróz gélelfő
- Southern blot, hibridizáció
- Autoradiográfia
- Eredmények kiértékelése:
 - a) polimorf mintázat: ha két egyed olyan restrikciós fragmentumban különbözik, amely homológ a próbával (a sávok különböző helyen lesznek az autoradiogrammon)
 - b) monomorf mintázat: azonos helyen

Előnyök:

- A kimutatott polimorfizmusok kodominánsan öröklődnek
- Független a génexpressziótól
- Közvetlenül tükrözik a DNS szekvenciában lévő különbséget
- Mutációs esemény jelzése: deléción, inszerción
- Független a környezettől

Hátrányok:

- Idő-, pénz-, munkaigényes
- Izotópos jelölés veszélye

A PCR technikán alapuló molekuláris biológia módszerek

RAPD (Random Amplified polymorphism DNA)

- A genom ismeretlen DNS szekvenciáinak felszaporítása
- Agaróz gélelfő
- Markerekkel történő azonosítás

Polimorfizmus okozója:

- A primer kötőhelyének szekvencia különbsége
- Az amplifikált régióban vagy a primer kapcsolódási helyén deléción, inzerción vagy inverzió

Előnyei:

- Gyors, viszonylag egyszerű műszererezettség

- Izotóp használata nélkül nagyszámú minta vizsgálható
- Kevés DNS templát is elegendő

Hátrány:

- A RAPD-ok domináns öröklődésűek, ezért heterozigóta genotípusok kimutatására nem alkalmasak.

Alkalmazási területek:

- Genetikai különbözőség és rokonság megállapítása
- Tulajdonságok térképezése
- Beltenyésztett vonalak homozigótaságának megállapítása
- Fajták homogenitás vizsgálata
- F₁ hibrid vetőmagok uniformitásának megállapítása

3. táblázat. A DNS-szintű polimorfizmus vizsgálati technikák összehasonlítása (NAGY, 1999 nyomán).

Tulajdonság	Markertípus								
	RFLP	RAPD	CAPS	SCARs	Oligonukleotid fingerprinting	AFLP	Mikro-szatellittek	ISSR	SAMPL
Előfordulási gyakoriság a genomban	nagy	nagy	közepes	közepes	nagyon nagy	nagyon nagy	nagy	nagy	nagy
A polimorfizmus mértéke	közepes	kicsi	közepes	közepes	nagy	nagy	nagyon nagy	nagy	nagy
Egy vizsgálat során detektálható allélek száma	1–2	1–3	1	1	5–50	5–15	1–2	1–10	1–5
Dominanciajelleg	kodomináns	domináns	kodomináns	kodomináns	domináns	domináns	kodomináns	domináns	kodomináns
Reprodukálhatóság	kiemelkedő	gyenge	közepes	jó	közepes	jó	jó	közepes	közepes
Egy vizsgálathoz szükséges DNS-mennyiség [µg]	1–10	0.01–0.05	0.05–0.2	0.05–0.2	1–10	0.2–0.5	0.05–0.1	0.05–0.1	0.2–0.5
Szekvenciainformációk igénye	nem	nem	részben	igen	nem	nem	igen	nem	nem
Fejlesztési költségek	közepes	kicsi	közepes	közepes/nagy	közepes	közepes	nagyon nagy	közepes	közepes
Felszerelésigény és adaptációs költség	nagy	közepes	közepes/nagy	közepes/nagy	nagy	nagyon nagy	nagyon nagy	nagyon nagy	nagyon nagy
Alkalmazási költségek	közepes/nagy	közepes	közepes	közepes	közepes/nagy	nagy	közepes/nagy	közepes/nagy	nagy

A különféle DNS-szintű polimorfizmus vizsgálatok összehasonlításáról ad tájékoztatást a 3. táblázat. Laboratóriumi felszereltségtől, a kísérlet célkitűzésétől függően lehet megválasztani az adott módszert

AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

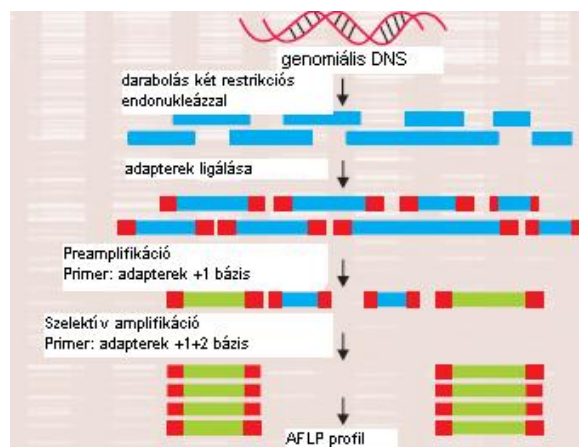
A számtalan, polimeráz láncreakción alapuló módszer közül az egyik legdrágább, de legnagyobb felbontó képességű az amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus (AFLP). Ehhez bármilyen sejtől származó DNS megfelelő.

A vizsgálat során detektálásra kerülő fragmentumok száma a megfelelő primer set kiválasztásával beállítható. Az AFLP technika valójában nem a DNS fragmentumok hosszában meglévő különbség kimutatására alkalmas, hanem az adott restrikciós fragmentumok jelenlétét illetve azok hiányát szemlélteti.

Az AFLP technika a teljesen emésztett genomikus DNS restrikciós fragmentumok szelektív PCR-rel történő felszaporításán alapszik. Az AFLP hatékony DNS ujjlenyomat technika, amely különböző komplexitású és eredetű genomok összehasonlító elemzésére alkalmas.

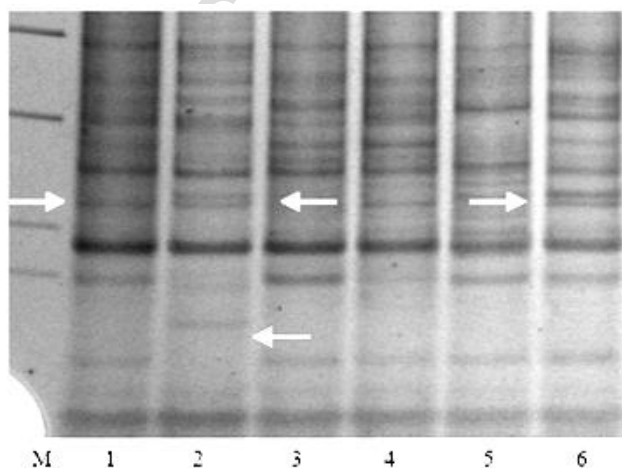
Az AFLP technika alkalmazásakor a DNS-t restrikciós endonukleázokkal kisebb fragmentumokra darabolják, majd duplaszálú adapterek ligálása történik a DNS fragmentumok végeihez.

Ezek templátként szerepelnek a DNS amplifikáció alatt. Az adapterek szekvenciája és a restrikciós helyek kötőhelyül szolgálnak a primer számára, ami az amplifikáció elindításához szükséges. Szelektív nukleotidokat (1–3 darabot) alkalmaznak a PCR primerek 3' végén, így a DNS fragmentumoknak csak egy meghatározott hányada amplifikálódik, azok a nukleotid darabok, amelyek adapter utáni szekvenciája megegyezik a primer szelektív nukleotidja(i)val (5. ábra).



5. ábra. AFLP sémája (<http://irc.igd.cornell.edu/MolecularMarkers/AFLPs.pdf> nyomán)

Az AFLP markerek magas reprodukálhatóságot mutatnak ellentétben a RAPD markereivel. Nagy előnye az AFLP módszernek, hogy egyetlen PCR reakció jelentős polimorfizmus detektálását teszi lehetővé. Kivitelezéséhez nincs szükség előzetes szekvencia információkra, ezenkívül a reakciók eredményeként kapott komplex sávmintázatokban közeli rokon genotípusok esetén is viszonylag nagy valószínűséggel találhatók több lókuszra nézve polimorf fragmentumok.



Az alsó nyíl egy fajra jellemző vonalat jelöl, a felső nyílak az 1, 2 és a 6 mintára jellemző egyedi vonalakat jelölnek.

6. ábra. Hat *Crocus* faj DNS mintázata. Példák az AFLP gyakorlati hasznosítására (ZUBOR et al. 2003 nyomán).

A 6. ábrán jól láthatóak az egyes fajok eltérő DNS mintázatai. A sávok jelenléte illetve nemléte alapján statisztikai számítást lehet végezni több módszer alapján.

Példánkban a Jaccard indexet mutatjuk be, de számos egyéb módszer (Dice, SM, stb.) is megtalálható a hallgatók által is hozzáférhető SPSS for Windows statisztikai programcsomagjában.

A sávokat binárisan kódoljuk (1= jelenlét, 0= nincs) az MS Excel program segítségével és innen másoljuk át az SPSS programcsomagba, vagy közvetlenül az SPSS adattáblájában és rögtön kezdődhet az adatok értékelése.

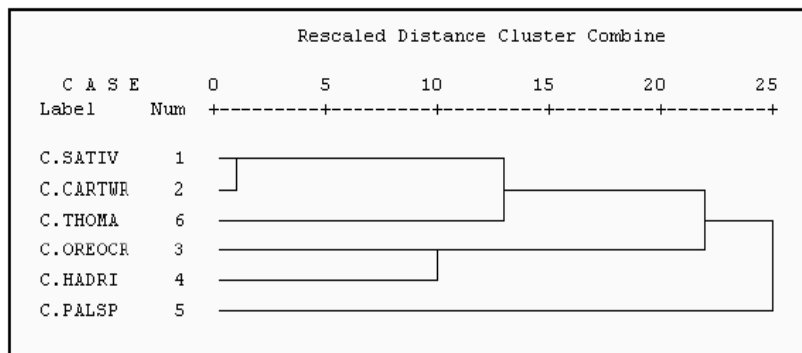
A fajok közötti hasonlósági koefficiens (4. táblázat) Jaccard index alapján a következő képlet szerint számítjuk ki: a Jaccard index megadja annak a valószínűségét, hogy a két vizsgált fajta egyezik legalább egyikük jellemző fragmentumában:

$J = a/(n-d)$, ahol a: jelenti a mindkét objektumban amplifikált fragmentumok számát, d: a két aktuális objektumból együttesen hiányzó változók számát, n: az összes változó számát. A képlet alapján genetikai távolságot is számíthatunk, melynek értékhatára szintén 0 és 1 közé esik: Genetikai távolság = $\sqrt{1-J}$ Jaccard index értéke. (HAJÓSNÉ, 1999 nyomán)

4. táblázat: A hat *Crocus* faj statisztikai értékelése Jaccard index alapján

	C. sativus	C. cartwrightianus	C. oreoreticus	C. hadriaticus	C. pall. ssp. Pall.	C. thomasi
C. sativus	1,000	0,850	0,682	0,652	0,609	0,750
C. cartwrightianus	0,850	1,000	0,583	0,560	0,520	0,714
C. oreoreticus	0,682	0,853	1,000	0,773	0,652	0,565
C. hadriaticus	0,652	0,560	0,773	1,000	0,560	0,609
C. pall. ssp. pall.	0,609	0,520	0,652	0,560	1,000	0,565
C. thomasi	0,750	0,714	0,565	0,609	0,565	1,000

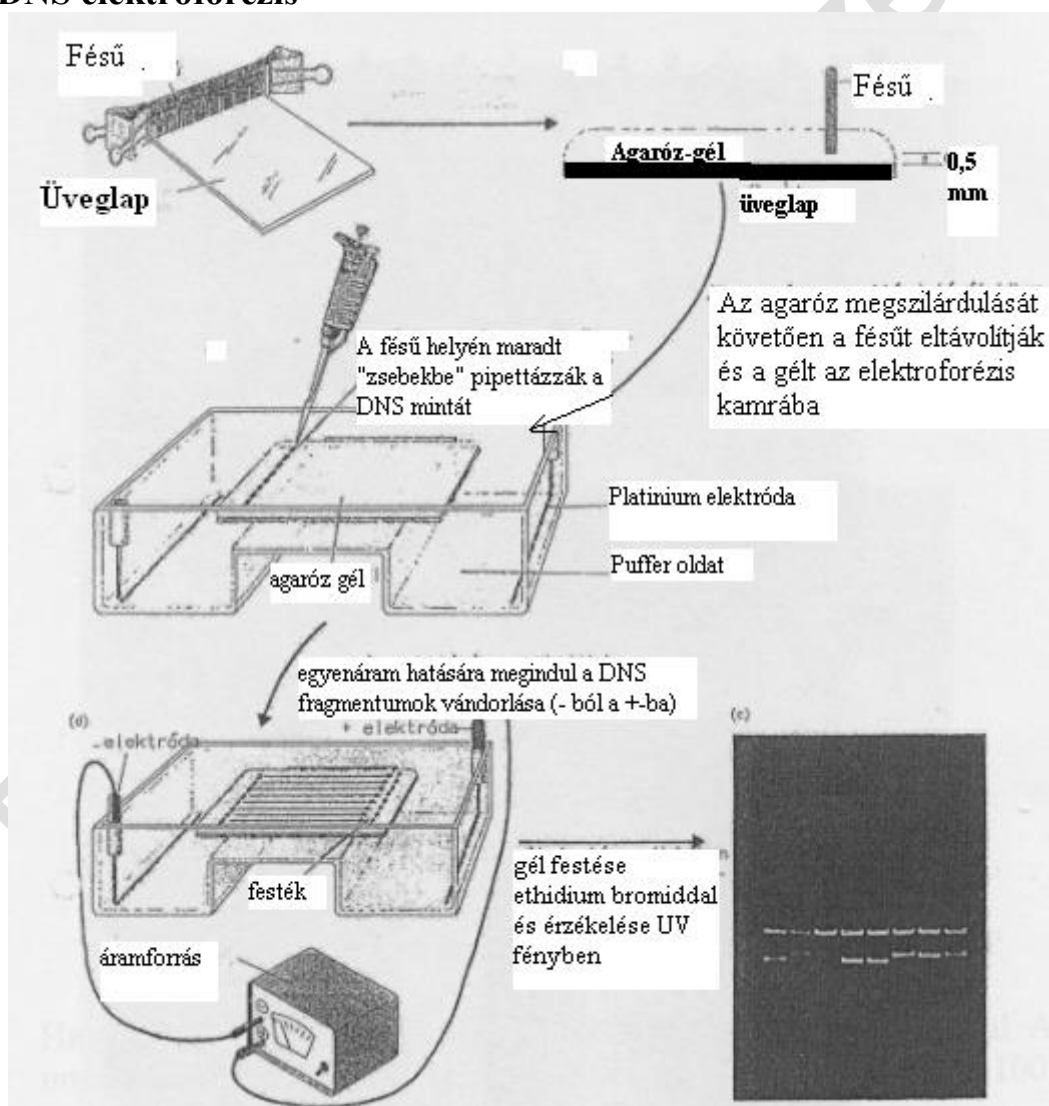
Az adatok alapján csoportosítást, jelen esetben hierarchikus clusteranalízist is végezhetünk a fajokkal, így faágszerűen kirajzolódik a fajok közötti különbözőség mértéke (7. ábra).



7. ábra. A hat *Crocus* faj rokonsági fokának dendrogramja

5. Rekombináns DNS technika

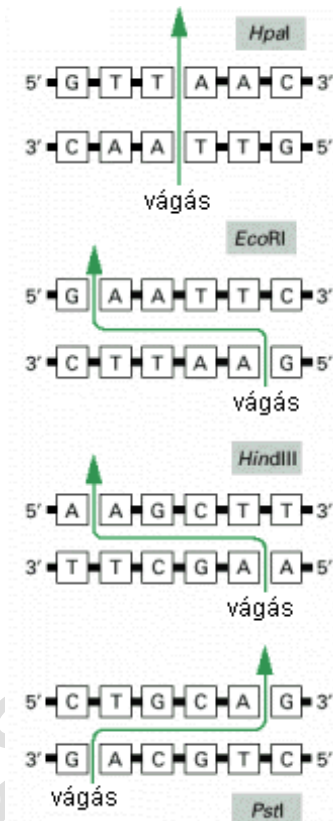
5.1. DNS elektroforézis



8. ábra. DNS elektroforézis gyakorlati menete (HESZKY és GALLI, 2006 nyomán)

A DNS fragmentumok elválasztásának az elve: a DNS fragmentumok hosszúságuktól függő távolságra tudnak vándorolni a gélen. A kapott sávokban azonos de más sávoktól eltérő hosszúságú DNS fragmentumok tömege figyelhető meg (8. ábra). További példák az AFLP részletezésénél.

5.2. Restriktációs endonukleázok



9. ábra. Restriktációs endonukleázok, mindig azonos módon, meghatározott helyen, az adott enzimre jellemző felismerési szekvencián belül vagy annak közelében hasítják a DNS-t. Több száz ismert restriktációs enzim van kereskedelmi forgalomban.

Az 9. ábra a DNS-szekvenciát felismerő négy gyakran használt restriktációs enzimet mutat. A felismert szekvenciák általában hat bázispárból állnak, és „palindrom” szerkezetűek (a két szálon ellentétes irányból „olvasva” ugyanaz a szekvencia).

A *HpaI* „tompá” véget vág, azaz hasítás után 3–3 bázispár marad a két végen, míg a többi „ragadós” véget, vagyis a hasítás nem szimmetrikus, mindkét szálon „túlnyúló” bázisok maradnak.

Az enzimeket a következő élőlényekből izolálták:

HpaI: *Hemophilus parainfluenzae*

EcoRI: *Escherichia coli*

HindIII: *Hemophilus influenzae*

PstI: *Providencia stuartii*

5.3. Polimeráz láncreakció

Ezért a felfedezésért Kary B. Mullis (USA) 1993-ban Nobel díjat kapott.

Egy DNS szakasz végtelen számú másolatának előállítása a DNS-polimeráz segítségével.

A folyamathoz szükséges: templát DNS + oligonukleotid primer + DNS-polimeráz + nukleozid trifoszfátok + Mg^{2+} vagy Mn^{2+} + DNS puffer (a DNS polimeráz aktivitásának és stabilitásának fenntartásáért).

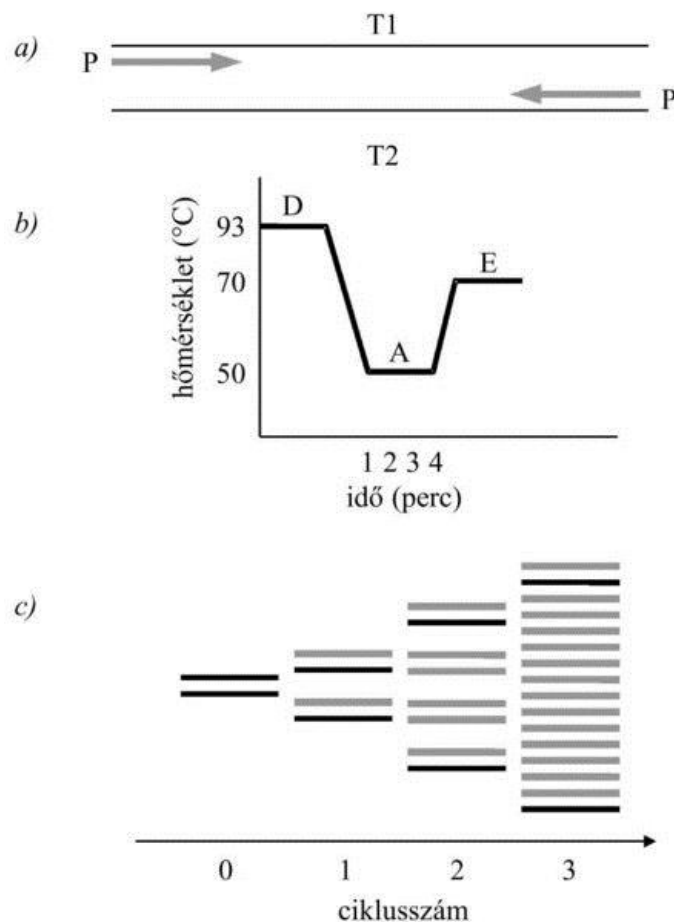
DNS templáthoz felhasználható bármilyen olyan sejt, mely DNS-t tartalmaz.

A folyamat lényege (PCR /Polymerase chain reactions/ készülékben):

- DNS szálak szétválása (melegítés $90-94\text{ }^{\circ}\text{C}$),
- Primer kapcsolás (a primer szekvenciájától függően),
- Komplementer szál szintézise DNS polimerázzal ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$),
- Majd a ciklus újraindul az elejétől, ezáltal a DNS fragmentumok száma folyamatonként exponenciálisan nő.

Elméletileg egy DNS szakaszból elkezdve a ciklust néhány óra alatt milliárdnyi DNS fragmentumot (másolatot) elő lehet állítani (10. ábra).





10. ábra. A polimeráz-lánreakció-ciklus elve. A ciklus ismétlődő lépései (b): denaturálás magas hőfokon, amikor a DNS-szálak szétválnak (D), az alkalmazott primerek tapadása, kapcsolódása (annealing, A), majd a DNS szakasz polimerizációja (extension, E). Az a) diagramm a szétvált templát szálakon (T1, T2) ellentétes irányban meginduló polimerizációt mutatja. Az ismétlődő ciklusok során a DNS-szakasz exponenciális ütemben szaporodik (c) (Hoelzel – Dover, 1991 nyomán)

5.4. Rekombináns DNS technika

1869: *Miescher* először izolál DNS-t gennyből származó fehérvérsejtekből.

1944: *Avery* bizonyítja, hogy nem fehérje, hanem DNS hordozza a genetikai információt baktériumok transzformációja során.

1953: *Franklin és Wilkins* röntgenkristallográfiai adatai alapján *Watson és Crick* javaslatot tesz a DNS kettős hélix-szerkezetére.

1955: *Kornberg* felfedezi a DNS-polimeráz enzimet.

1961: *Marmur és Doty* felfedezi a DNS–renaturációt, mely a nukleinsav–hibridizáció során megteremti a reakció specificitását.

1962: *Arber* elsőként bizonyítja a restrikciós endonukleázok létezését, ezzel megteremti a lehetőséget *Nathan és H. Smith* számára az enzimek tisztítására és felhasználásukra a DNS–szekvenciák jellemzésében.

1966: *Nirenberg, Ochoa és Korana* tisztázza a genetikai kódot.

1967: *Gellert* felfedezi a DNS–fragmentumokat összekötő enzimet, a ligázt.

1972–73: *Bover, Cohen, Berg* és munkatársai a San Francisco–i Stanford és Kalifornia Egyetemeken kifejlesztik a DNS–klónozási technikákat.

1975: *Southern* kidolgozza a specifikus DNS–fragmentek detektálására alkalmas hibridizációs eljárást.

1975–77: *Sanger és Barrell*, valamint *Maxam és Gilbert* gyors DNS–szekvenáló módszereket fejlesztenek ki.

1981–82: *Palmiter és Brinster* transzgénikus egeret, míg *Spradling és Rubin* transzgénikus ecetmuslicát hoz létre.

1982: A Los Alamos–i Nemzeti Laboratóriumban létrejön a GenBank nevű nyilvános DNS–szekvencia–adatbázis.

1985: *Mullis* és munkatársai feltalálják a polimeráz–láncreakciót.

1987: *Capecchi és Smithies* célzott génbevitelre alkalmas módszereket mutatnak be egérembriók csírasejtjein.

1989: *Fields és Song* kidolgozza az élesztő kettőshibrid–rendszert, mely alkalmas fehérjék kölcsönhatásainak vizsgálatára.

1990: *Lipman* és kollégái munkája nyomán elkészül a BLAST algoritmus, mellyel DNS–és fehérjeszekvenciákat lehet összehasonlítani.

1990: *Simon* és munkatársai tanulmányozzák, hogyan lehetséges mesterséges bakteriális kromoszómákba (BAC) „csomagolni” hosszú emberi DNS–darabokat.

1991: *Hood és Hunkapillar* új, automatizált DNS–szekvenálási módszert vezet be.

1995: *Venter* és munkatársai megszekvenálják az első teljes genomot (*Hemophilus influenzae*).

1996: *Goffeau* vezetésével egy nemzetközi konzorcium bemutatja az első megszekvenált eukarióta genomot (*Saccharomyces cerevisiae* – élesztő).

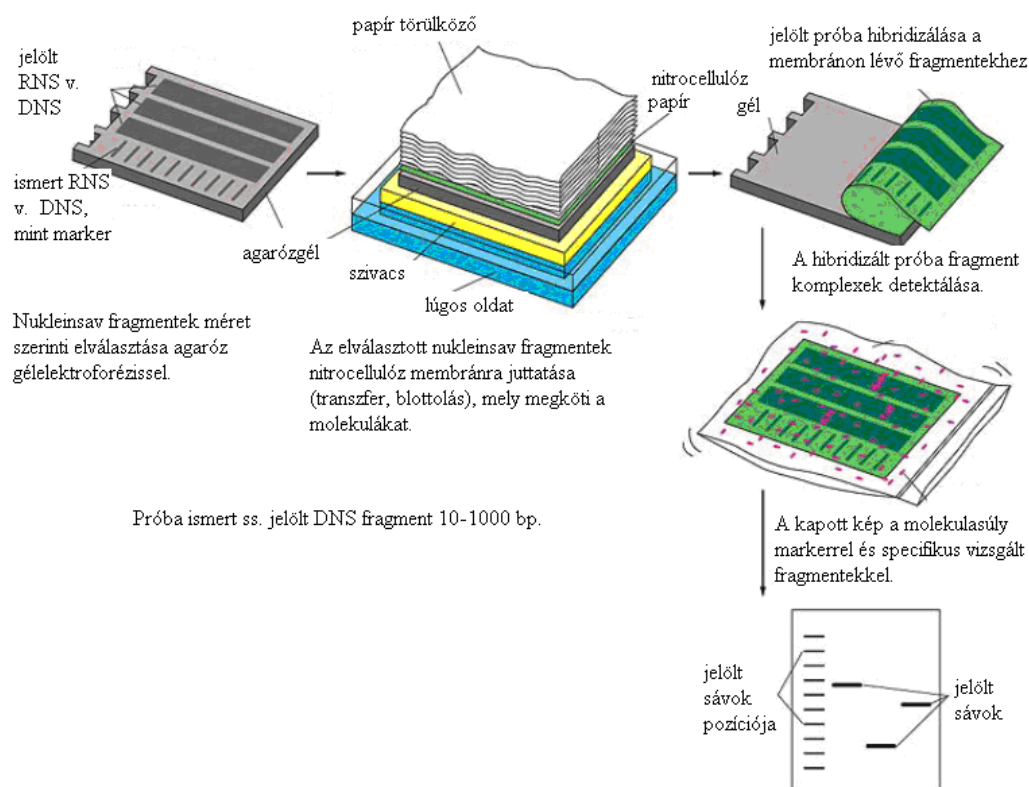
1996–97: *Lockhart, Brown és DeRisi* kifejlesztik a DNS–microarray technikát, mellyel gének ezreit lehet egyidejűleg tanulmányozni.

1998: *Sulston, Waterston* és kollégáik megszekvenálják az első többsejtűt, a *Caenorhabditis elegans* fonálférget.

2001: Egy nemzetközi konzorcium bejelenti, hogy elkészült az emberi genomszekvencia vázlata.

2006: A genetikailag módosított növények vetésterülete meghaladja a 90 millió hektárt a Földön.

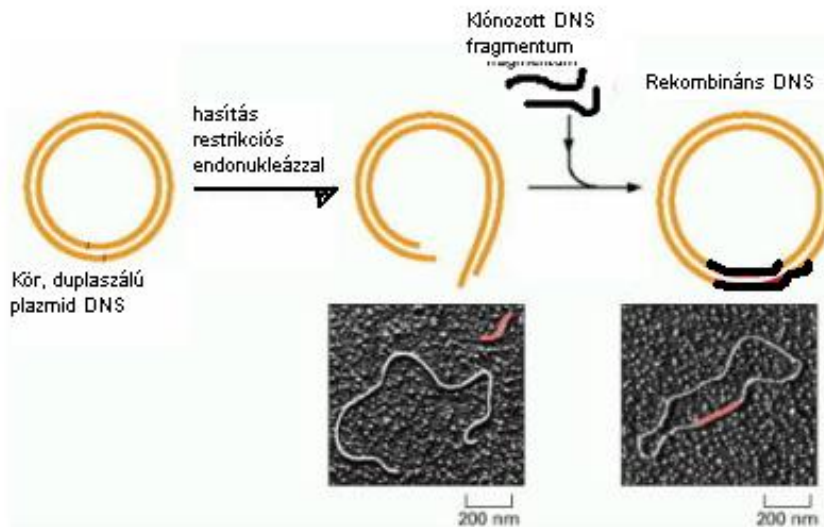
5.5. Nukleinsav hibridizáció



11. ábra. Nukleinsav hibridizáció

(www.nyf.hu/others/docs/mol-biol/9_sgm/mgac.ppt nyomán)

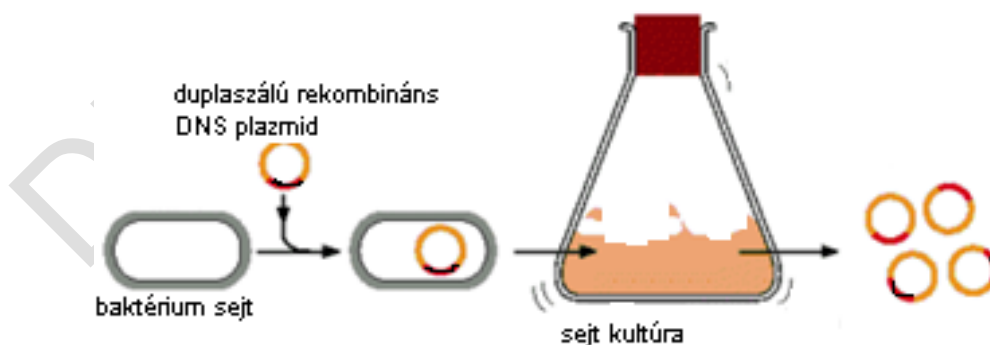
5.6. DNS klónozás plazmidvektorokba



12. ábra. DNS klónozás plazmidvektorokba

(www.nyf.hu/others/docs/mol-biol/9_sgm/mgac.ppt nyomán)

DNS–fragment (inszert) bejuttatása bakteriális plazmidba (vektor) ligáz segítségével (12. ábra). A cirkuláris plazmidot ugyanazzal a restrikciós enzimmel hasítjuk, mint amelyik a bejuttatni kívánt inszert végeit létrehozta (komplementaritás). A reakció során a plazmid és az inszert mellé ligázt és ATP-t adunk. Az enzim a komplementer végeknél összeköti a két DNS-t, mintegy „összeforrasztja” a plazmidon keletkezett törést. A létrejött rekombináns, cirkuláris molekula (ún. konstrukt vagy konstrukció) így két különböző eredetű DNS-t tartalmaz.



13. ábra. Konstrukció sokszorosítás

(www.nyf.hu/others/docs/mol-biol/9_sgm/mgac.ppt nyomán)

A konstrukciót baktériumokba juttatják, melyek osztódásaik során exponenciálisan sokszorozzák a DNS mennyiségét (13. ábra).

A DNS ezek után izolálható a következő lépések során:

1. A baktériumok lízise (feltárása)
2. Megtisztítás a különböző fehérjéktől és kromoszómális DNS-től
3. A plazmidok elkülönítése (megkötés pl. oszlopon vagy kicsapás)
4. A plazmidok oldatba vitele (eluálás az oszlopról vízzel/megfelelő pufferrel vagy a csapadék feloldása)

6. Genetikailag módosított szervezetek létrehozása, mezőgazdasági alkalmazása

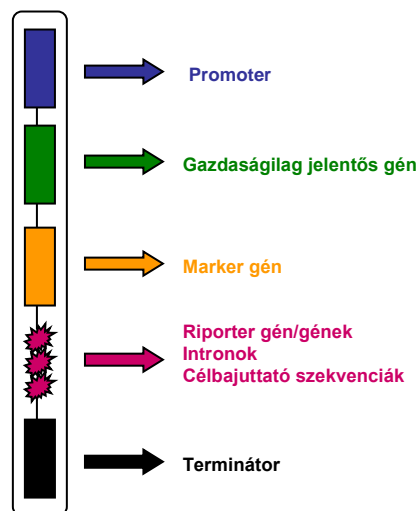
A transzgénikus szervezetek előállítása

A GM-növények előállítása *in vitro* rekombináns DNS-technikával történik, az alábbiak szerint. Egy donor fajból izolálnak egy gazdaságilag értékes gént például a gyomirtószer ellenállásért felelős gént. Ehhez az értékes génhez laboratóriumi módszerekkel hozzákapcsolják az alábbi szekvenciákat (14. ábra):

- promóter (szabályozó) szekvencia, amely meghatározza a gén működését azt, hogy a növény melyik sejtjében történjen a fehérjeszintézis

A promóter két fajtáját különböztetjük meg:

- általános promóterek, melyek a géneket minden sejtben és folyamatosan bekapcsolva tartják
- specifikus promóterek, amelyek bizonyos fejlődési szakaszokra jellemző géneket működtetik
- marker (jelző) gén, amely jelzi, hogy sikeres volt a génátültetés ez a gén antibiotikum rezisztenciát hordoz
- riporter gén, amely bizonyítja a transzgén kifejeződését (expresszió)
- intronok, amelyek növelik a transzgén fehérje termékének mennyiségét, azáltal, hogy fokozzák az átírást
- terminátor (befejező) szekvencia, amely jelzi a genetikai információ végét



14. ábra. Transzgén felépítése

Az így kapott génkomplexet be kell juttatni a recipiens növénybe. Ez az eljárás történhet közvetett vagy közvetlen transzformációval.

Transzgénikus növények létrehozása

1. Gén izolálás (mikroorganizmusok, gomba, növény, állat, rovar, ember)
2. Transzformációs vektorba építés (promóterek, markergének, terminátorok, bakteriális plazmid)
3. Géntranszfer (transzformációs vektor bejuttatása a kívánt genotípus sejtjeibe)
4. Transzformáns sejtek szelekciója (marker génnel)
5. Transzgénikus növényregenerálás
6. Transzgénikus növények laboratóriumi vizsgálata (stabilitás, expresszió, öröklődés, stb.)
7. Transzgénikus növények szántóföldi tesztelése, nemesítése (jogi szabályozás, engedélyezés, környezeti rizikófaktorok, stb.)
8. Transzgénikus növények minősítése (jogi szabályozás),
9. Transzgénikus növényekből származó élelmiszerek forgalmazása (jogi szabályozás).

A transzgénikus (GM) növényfajta előállításának fontosabb lépései:

- 1–3: molekuláris biológiai módszerek
- 4–6: sejt- és szövettenyésztési módszerek

7–9: klasszikus nemesítési módszerek

Transzgénikus növények létrehozása során a konstrukciót (gént) növényi sejtbe juttatjuk különböző módszerek segítségével, melyet az beépít génállományába, és a kifejezett növényen a beépített gén kifejeződése következtében láthatóvá válnak azok a tulajdonságok, melyeket kódol.

Transzformáció típusai

I. Közvetett transzformáció

- *Agrobacterium ssp.*
- vektorok virális
- vektorok

II. Közvetlen transzformáció

1. Intakt sejt, szövet transzformáció

- génpuska (particle gun)
- makroinjektálás
- szilikonkarbid kristályos

2. Protoplaszt transzformáció

a) kémiai

- PEG
- CaCl_2

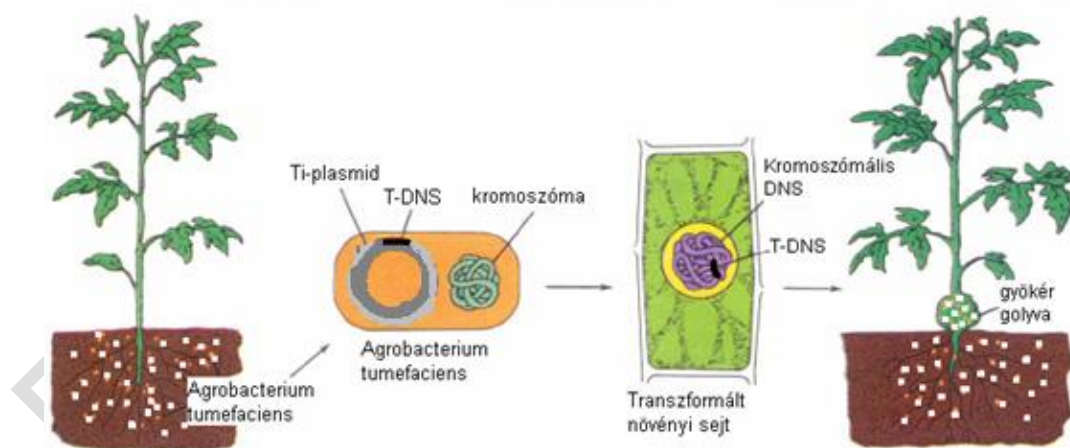
b) fizikai

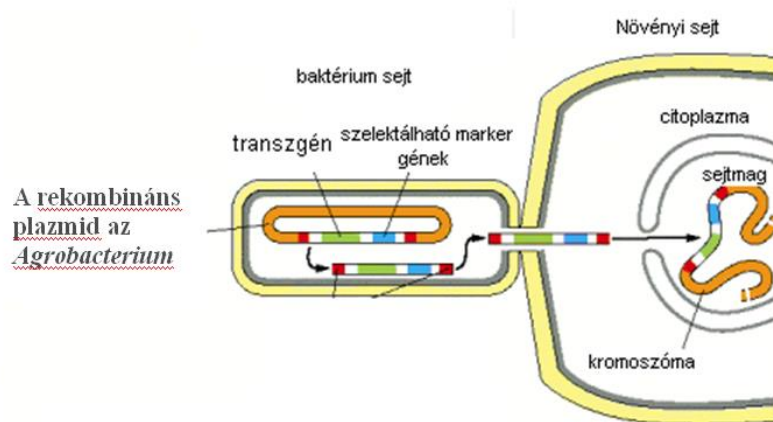
- elektroporáció
- elektrofúzió
- ultrahangos kezelés
- mikroinjektálás

Közvetett (indirekt) transzformáció

Közvetett (indirekt) transzformációról abban az esetben beszélünk, amikor közvetítő organizmus segítségével történik a DNS bejuttatása a genomba. A legtermészetesebb génátviteli rendszer az *Agrobacterium tumefaciens* talajban élő

Gram–negatív baktérium, amely kétszikűket fertőző növénypatogén törzs. A talajbaktérium által okozott betegség a gyökérgolyva. Az *Agrobacterium tumefaciens* tartalmaz egy TI (tumor indukáló) plazmidot, amelynek egy része a transzfer vagy T–DNS a baktériumfertőzés során átkerül a növényi sejtekbe és stabilan integrálódik a sejtmag DNS–ébe. A TI plazmid tumorkeltő képességét eltávolították, és így módon használják fel vektorokként „idegen” DNS szakaszoknak a gazdanövények kromoszómaiba történő beviteléhez. A T–DNS mintegy 20 kbp hosszúságú, két rövid, 25 bázispár hosszúságú ismétlődő határszekvencia veszi körül. A két szakasz közötti gének nem befolyásolják a fertőzőképességet, a virulenciát, a génátvitelt és az integrációt, így ezek a részek kicserélhetők más DNS szakaszokra is, melyek akár 50 kb hosszúságúak is lehetnek. A határszekvenciák közé épített idegen DNS szakasz a baktériumos fertőzés folyamán a T–DNS–sel együtt kivágódik, átkerül a növényi sejtbe, majd integrálódik a sejtmagi DNS–be. A genomba juttatandó T–DNS szakaszokba általában rezisztencia géneket is elhelyeznek, ami lehetővé teszi a transzformáns növények egyszerű szelektálását (15. ábra).





15. ábra. A Ti plazmid felhasználása vektorként.

(internet:croptechnology.unl.edu/download.cgi nyomán)

Ez a vektor a kétszikű növényeknél jól bevált. A transzgenikus növény regenerálódását laboratóriumi (*in vitro*) körülmények között vizsgálják. Az idegen gént hordozó, úgynevezett transzgenikus növény előállításához általában szükség van a testi sejtekből történő hajtás indukcióra, tehát a sikeres transzformációhoz rendelkezésre kell állnia egy működő és hatékony regenerációs rendszernek.

Közvetlen transzformáció

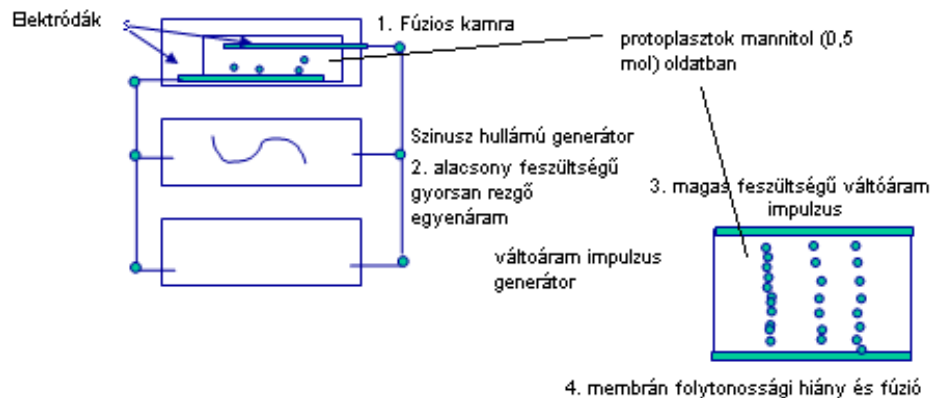
Közvetken transzformációról beszélünk abban az esetben, amikor közvetlenül juttatjuk be a DNS-t a recipiens szervezetbe fizikai kémiai hatás segítségével.

A közvetlen DNS-beviteli rendszerek a következők:

PEG (polietilén-glikol) kezelés olyan kémiai kezelés, amely során a protoplaszt szuszpenzióhoz idegen DNS-t tartalmazó oldatot adunk hozzá, majd ebbe csepegtetjük a polietilén-glikolt (PEG). A protoplasztok felszínére tapadt molekulák fúzió révén kerülnek be a citoplazmába. Hátránya, hogy a protoplasztokból történő növényregeneráció korlátozott.

Az **elektroporáció** a nagyfeszültségű, rövid időtartamú elektromos impulzusok használatára alapozott módszer. Elektromos impulzusokkal a sejtek DNS-felvétele fokozható. Rövid, megfelelő erősségű elektromos áram (5 ms, kV/cm) hatására

átmeneti (tranziens) lyukak keletkeznek a sejtfalmembránban, amelyen keresztül a DNS képes bejutni a sejtekbe (16. ábra).



16. ábra. Elektroporáció

(trc.ucdavis.edu/egsutter/PLB153/PowerPoint/ProtoplstFusion.ppt nyomán)

Egyszerű, gyors, olcsó eljárás azonban hatékonysága alacsony. Fromm és munkatársai adtak hírt elsőként kukorica protoplasztokba történő sikeres génbevitelről elektroporáció alkalmazásával 1985-ben.

A **kombinált fizikai és kémiai kezelés** során a protoplaszt–DNS szuszpenzióhoz PEG oldatot adnak, majd ezt követően elektroporálják a protoplasztokat.

A **mikroinjektálás** a mechanikai úton történő génbevitel hatékony formája. Mikrokapillárisok és mikroszkópi eszközök felhasználásával DNS-t visznek be a sejtek citoplazmájába, sejtmagjába vagy organelumaiba, és amennyiben az injektált sejt túléli a beavatkozást, osztódni kezd. A műveletet mikroszkóp alatt, mikromanipulátorral végzik, a manipulátor egyik karja rögzíti a protoplasztot, a másik beinjektálja a DNS oldatot adagoló szivattyú segítségével.

Az **ultrahanggal (szonikáció)** történő génbevitelt olyan növényeknél alkalmazzák, ahol a protoplasztrendszer jól működik, illetve a kalluszból történő növényregenerálás könnyen indukálható. A puffer-oldatban lévő transzformálandó sejteket rövid ideig magas frekvenciájú ultrahang hatásának teszik ki, így az idegen DNS bejuthat a növényi sejtbe. Előnye, hogy egyszerűbb módszer, mint a PEG vagy az elektroporáció.

Makroinjektálás növényi szövetekbe. Ezen eljárás során nem különálló sejtekbe juttatják az idegen DNS-t, hanem embriogén (regenerálható) sejtcsoportokba.

Száritott embriók DNS oldatban történő áztatása. A száraz növényi szövetek membránjainak fiziko-kémiai jellemzői erősen változnak a természetes kiszáradás folyamán, így a DNS óriásmolekulák is bejuthatnak a növényi sejtekbe.

A **pollentömlő eljárás** egyszerű változatát Duan és Chen (1985) használta először, amikor egy bíbor színű rizsfajta teljes genomikus DNS-kivonatát egy közönséges rizsfajta virágzatába juttatták úgy, hogy a befogadó virág bibeszálát felénél elvágva a vágott felületre cseppentettek egy kis mennyiségű DNS oldatot. Az eljárást azóta tovább fejlesztették, azonban a transzformációs hatékonysága igen alacsony, ezért alig használatos.

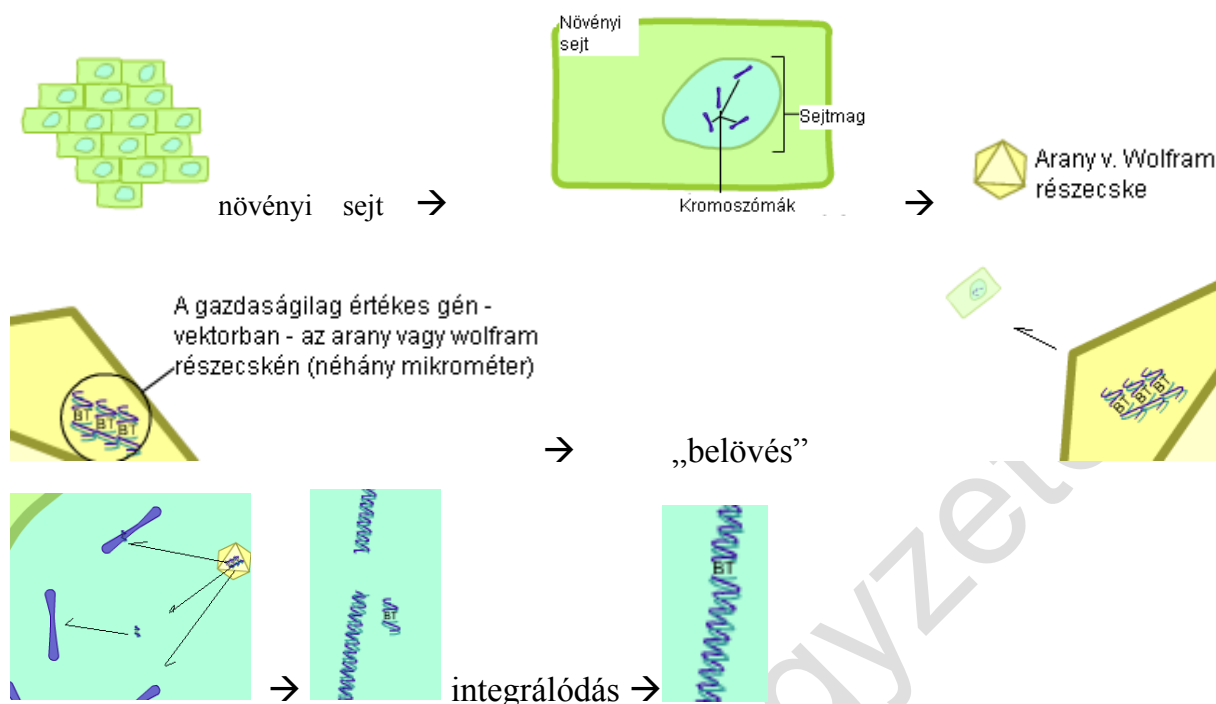
Mikrotűk alkalmazása során a tenyésztett növényi sejteket folyékony táptalajban, **szilikon-karbid mikrotűk** és plazmid-DNS jelenlétében rázatják. A szilikon karbid tűk mikroméretű injekciós tűkként működnek ($0.6 \mu\text{m} \times 10\text{--}80 \mu\text{m}$), áthatolnak a sejtfalon és sejtmembránon és ily módon bejuttatják a rájuk tapadt DNS-t a sejtbe. A módszer előnye, hogy egyszerű és olcsó; hátrány, hogy a sejtek könnyen károsodhatnak és a regenerációs hatékonyság alacsony.

Génbelövéses módszer a növényekbe történő génbevétel egyik legújabb megközelítése. A génbelövés kifejezés a módszer lényegére utal, a DNS-t az élő sejtekbe, szövetekbe egy génbelövő készülékkel – génpuskával (17. ábra) – juttatják be.



17. ábra. "Génpuska" (particle gun)

Az eljárás lényege, hogy a kiválasztott gazdaságilag fontos tulajdonság izolált DNS-ét hordozó mikrolövedékeket (wolfram vagy arany részecskéket) 50 bar nyomásértékű N_2 gáz és $-0,7$ bar vákuum egyidejű alkalmazása mellett nagy sebességre gyorsítjuk fel, így a részecskék áthatolnak a sejtfalon és a sejtmembránon, magukkal szállítva a sejtek belsejébe az idegen DNS-szakaszokat. A sejtek egy része túléli az így okozott sérülést, genomjába a belőtt izolált DNS-t is beépítheti, majd osztódik és ezekből a sejtekből megfelelő szelekciós körülmények között növények regenerálhatók (18. ábra).



18. ábra. A génbelövésees transzformáció sémája

(internet:croptechnology.unl.edu/download.cgi nyomán)

A génbelövést követő néhány napban a markergének és a riportergének már jelzik, jelezhetik a sikeres transzformációt. A módszer előnye, hogy valamennyi növényfaj esetén alkalmazható.

Transzgénikus növények csoportosítása

Csoportosítás gazdasági jelentőség alapján

Első generációs transzgénikus növények azok, amelyek biotikus és abiotikus rezisztenciával rendelkeznek. Ezeknél a GM növényeknél a molekuláris stratégia célja a növénytermesztés technológiájának segítése volt.

Második generációs transzgénikus növények a növekedésben és fejlődésben, valamint az anyagcserében módosított GM növények. Az 1990-es években a hangsúly ezen növények előállításának irányába tolódott el.

Harmadik generációs transzgénikus növények esetében a cél, olyan GM növények előállítása, melyeket, mint bioreaktorokat lehet felhasználni speciális molekulák, ipari alapanyagok, fehérjék, enzimek stb. előállítására.

6.1. Genetikailag módosított növények és előfordulásuk

Napjainkban a GM növények vetésterülete meghaladja a 170 millió ha-t. Legnagyobb területen a szóját, a kukoricát, a gyapotot és a repcét termesztik. A kutatók 1983-ra kifejlesztették azokat a módszereket, amelyek lehetővé tették a növények genetikai módosítását. Ezt követően több mint tíz évbe tellett mire az első genetikailag módosított (GM) növények 1996-ban köztermesztésbe kerülhettek. 1996-tól kezdődően rohamosan nőtt a genetikailag módosított növényekkel bevetett terület nagysága 2005-re elérte a 90 millió hektárt, 2012-re a 170 milliót. A GM növényekkel bevetett terület 1996 és 2012 közötti 100-szoros emelkedése példátlanul magas, és ennek alapján a GM növények képviselik a leggyorsabban elterjedt növénytermesztési technológiát az újkori mezőgazdaság történetében.

2012-ben 28 országban termesztettek genetikailag módosított növényeket, 10 országban több mint 1 millió ha területen. A legnagyobb mennyiségben az USA-ban 69,5 millió ha-on vetettek GM növényeket (kukoricát, szóját, gyapotot, repcét, cukorrépát, papayát, tököt) (5. táblázat).

5. táblázat. Genetikailag módosított növények vetésterülete 2012-ben

Ország	Vetésterület (millió ha)	Főbb GM növények
USA	69,5	Kukorica, szója, gyapot, repce, cukorrépa, lucerna, papaya, tök
Brazília	36,6	Szója, kukorica, gyapot
Argentína	23,9	Szója, kukorica, gyapot
Kanada	11,6	Repcé, kukorica, szója, gyapot
India	10,8	Gyapot
Kína	4,0	Gyapot, papaya, paradicsom, paprika
Paraguay	3,4	Szója, kukorica, gyapot

A vetésterületek 89%-a az USA-ban, Brazíliában, Argentínában, Kanadában és Indiában található., Észak-és Dél Amerika pedig az összes vetésterület 87%-át

mondhatja magáénak. Európában a vetésterületek Spanyolországban, Portugáliában, Csehország, Szlovákia és Romániában, találhatók.

Elsőként olyan fajták kerültek köztermesztésre, amelyek különféle agronómiai szempontból fontos tulajdonságokkal bírnak, mint a kártevőknek, betegségeknek való ellenállóképesség és a gyomirtószer tűrés. Az ebbe a csoportba tartozó első generációs genetikailag módosított növények száma ötven feletti. Ezek közül említésre méltó még a különböző növények vírus ellenállósága (burgonya, dohány, papaya, tök) és a burgonyabogár elleni védelem. A technológia jelenleg a szójában és a kukoricában a legelterjedtebb. Kukoricában elsősorban kukoricamoly, gyapottok bagolylepke, kukoricabogár ellen vagy gyomirtó szer ellenálló fajtákat termesztnek.

Az USA-ban 1994-ben az első génmódosított növényből származó termék a Flavr Savr paradicsom volt, amelyet az antiszensz poligalakturonáz gént tartalmazza. Ennek eredményeképpen a paradicsom száron érve is megtartja keménységét, s így éretten leszedve, jó ízű és a rákellenes anyagként is ismert likopén nevű vegyületet maximális mennyiségben tartalmazó termést hoz, javul az eltarthatósága valamint több antioxidánst tartalmaz, mint a nem módosított paradicsom. A termésérés során bekövetkező puhulást egy pektinbontó enzim, a poligalakturonáz (PG) okozza. A Calgene kutatói ezt az enzimet gátolták a következő módon: A PG-gén kódoló részét eredeti átírásával ellentétes irányban (antiszensz) összeépítették egy karfiol mozaikvírusból származó szabályozó elemmel, a CaMV35S-promoterrel, hogy folyamatos átírást biztosítsanak az antiszensz gén számára a növény minden szervében, köztük a termésben is. A PG-gén végére egy átírást befejező, ún. poliadenilációs szignált tettek. A létrehozandó GM-növények könnyű megtalálása, szelekciója érdekében a CaMV35S-aPG-fúzióhoz hozzáépítettek egy ugyancsak CaMV35S-promoterrel és poliadenilációs szignállal ellátott antibiotikum rezisztencia gént, a neomicinfoszfo-transzferázt (nptII). A konstrukciót egy korábban már kidolgozott transzformációs eljárással bejuttatták a paradicsom genomába. Az antiszensz PG génről átíródó mRNS kettős szálú RNS-t képezve a paradicsom eredeti PG-génjének mRNS-ével egy géncsendesítésnek nevezett természetes molekuláris

mechanizmus révén gátolta a PG-fehérje keletkezését. Az alacsonyabb PG-szint következtében a sejtfalban lévő pektin lassabban bomlott le, a termés sokáig kemény maradt (BÁNFALVI ZS., KONDRÁK M. 2005).

A Flavr Savr paradicsomot egy év múlva a későn érő paradicsom követte, amelynek etiléntermelését gátolták, és ezért hónapokig szobahőmérsékleten is tárolható volt anélkül, hogy beérett volna. Jelenleg a GMO-ba leggyakrabban beültetett gének rovarokkal vagy herbicidekkel szembeni ellenálló képességet biztosítanak. Az egyik cél olyan növény kialakítása volt, amely ellenáll bármely–a farmerek által használt–vegyi növényvédőszernek. Ilyen például a szója vagy a kukorica, amely olyan herbicideket tolerál mint a Round-Up (totális) herbicid, amely behatolva gátolja az aromás aminosavak felépítéséhez szükséges enzimet, így a növény elpusztul. A hozam növelését célzó herbicidellenálló kukoricafajtákat már termesztik. Az USA-ban már vetettek és arattak olyan kukoricát, amely saját, beépített inszekticiddel rendelkezik. Több GM növény fejlesztése van folyamatban. Egy eperfajtába a téli lepényhal fagyálló fehérjéjét vittek be, hogy a hideg éghajlaton is termesztethető legyen. Vannak fokozott tápértékű eperfajták, amelyek több ellagasavat (természetes rák elleni vegyület) tartalmaznak. A keményítőben gazdagabb burgonyafajtákat felhasználják olyan kis zsírtartalmú hasábburgonya és burgonyaszírom előállítására, amelyek akár öt évig is tárolhatók. A nagyobb keményítőtartalom kisebb zsírtartalmat eredményez, mivel a burgonya sütéskor nem tud annyi zsírt adszorbeálni. Kialakítottak egy rizsfajtát, amely már nem termel allergén faktort és egy salátát, amely kevesebb nitrátot tartalmaz. Ismeretes egy szőlőmag, amely gombákkal és herbicidekkel szemben ellenálló, valamint vannak ma már genetikailag módosított cikóriafajták is. Nem táplálkozás céljára szolgáló GM növényekkel is foglalkoznak, például színes szálakat termelő gyapottal és dohánnyal.

7. Búza (*Triticum aestivum* L.) agrobiotechnológia

7.1. A búza tulajdonságainak megváltoztatására szolgáló új eljárások

A növényi tudományokkal foglalkozók régóta arra törekednek, hogy a gazdaságilag fontos növények tulajdonságait minél nagyobb mértékben számunkra

előnyösen változtassák meg. A növényi tulajdonságokat a növények előállítása és termesztése során különböző, *in vivo* és *in vitro* módszerekkel befolyásolhatjuk különböző hatásokkal és eredményességgel.

A portok/mikrospóra tenyészet új dimenziókat nyitott meg a növénynemesítésben és a genetikai alkalmazások terén. A haploid technikák segítségével felgyorsítható a növények teljes homozigóta állapotának elérése és a recesszív gének expressziója. Hosszú ideig a gabonaféléket úgy tekintették, mint amelyek *in vitro* tenyésztési válasza nem kielégítő. A növénynemesítésben a haploid technika alkalmazását korlátozza, hogy a mikrospórákból indukált kalluszok és növények száma alacsony, továbbá az, hogy magas az albínó növények aránya. Különböző törekvések vannak a haploid technikák hatékonyságának növelésére. A dihaploid előállítás módszerének tovább fejlesztésre, kukorica megporzásos rendszerben auxin analógot (zearalenone, ZEN) alkalmaznak. Az eddigiek során a leghatékonyabb rendszert búza dihaploidok előállítására a mikrospórák kémiai indukciós kezelésével (HNA + 2,4 D + BAP) és a képződött embriogénikus mikrospórák élő búza ovariumokkal történő együtt tenyésztésével folyékony NPB 99 táptalajt alkalmazva érték el.

Ismert módszer a haploid technikák hatékonyságának növelésére a mikrospóra tenyésztés, amelyet több kutatócsoport is tanulmányozott az egyszikűek és a kétszikűek tekintetében. Az *in vitro* mikrospóra szelekciót sikeresen alkalmazták alumínium toleráns genotípusok kiválogatásánál. A folyékony táptalaj javította az *in vitro* portok kultúrák kallusz indukcióját búzában. A kalluszok regenerálódó képessége és a zöld növény–albínó haploid–arány azonban folyadékkultúrában általában kisebb volt, mint agar–táptalajon.

Erős genotípusos függőséget találtak az őszi búza intraspecifikus variabilitását vizsgálva a kalluszindukciós és növényregenerációs képességet illetően. Kolhicin indukciós táptalajhoz történő hozzáadásával egyes kutatók a hagyományos portoktenyésztéshez képest kedvezőbb eredmények érhetők el. A korábbi közleményekben az ajánlott módszerek igen komplikált eljárásokat is tartalmaztak,

úgy mint mikrospóra pre-, vagy szubkultúrát antératranszfert, pollenizolálást, centrifugálást és reszuszpendálást. A legjobb eredményeket haploid növények előállításában portokkultúra alkalmazásával akkor érték el, amikor portoktenyésztéshez használt donor növények növekedési feltételeit, a táptalaj összetételét és a nevelés feltételeit módosították. *In vitro* androgenezis segítségével létrehozott embriószerű struktúrákat (ELS) transzgénikus növények előállítására használnak fel, azonban a direkt androgenezis nem vezetett genom átrendeződésekhez, a búza dihaploidok genomiális DNS-ében nem tapasztaltak elérést.

A zöld haploid növények megjelenése a portok tenyésztés alkalmazásánál három komponenstől függ: a kezelt antérák embrioid produkciójától, az embrioidokból történő növényregenerációtól és a zöld növények százalékatól. Ezeket a komponenseket a donor növény heritabilitása határozza meg, de környezeti tényezők is befolyásolják. A búza portok tenyésztéséből történő haploid növény előállítás ma már gyakorlat, amely több növénynemesítési programban szerepel, köszönhetően az ezen a területen elért módszertani előrehaladásnak. Kertész és munkatársai sikeresen megoldották a dihaploidok felhasználását a búzanemesítésben, melynek révén két államilag elismert fajta született. Pauk és munkatársai (1995) az első magyar dihaploid őszi búzafajta (GK Délibáb) eredményeire hivatkozva megállapították, hogy a DH vonalak ugyanolyan értékesek lehetnek, mint a hagyományos nemesítésből származó források.

A portok kultúrákkal elérhető hozam erős genetikai kontroll alatt áll, amelyet a külső körülmények is befolyásolnak. Az *in vitro* kultúrákban érvényesülő genetikai hatásnak köszönhetően, csupán néhány genotípus bizonyult előnyösnek a portok tenyésztés alkalmazásánál.

A DH analógok növénynemesítési szempontból perspektivikusak, továbbá a F_3 – F_4 vonalak javasolhatók elsősorban haploid előállításra. A DH vonalak értéke az F_1 és F_2 utódok kísérletei alapján azonos a hagyományosokéval. Egyes kutatócsoportok vizsgálatai (SSR, STS, AFLP) szerint a hagyományos fajták legalább annyira homogénnek tekinthetők, mint a DH fajták.

A portok tenyésztés széles körű alkalmazásának további limitáló tényezője az, hogy a zöld növények kis számban regenerálhatók. A kutatók figyelme ennek következtében elsősorban annak a vizsgálatára irányult, hogy a táptalaj összetevői hogyan hatnak a zöld növények arányára.

Magyarországon az 1960-as évek közepétől kezdtek el foglalkozni a búzafajták kombinálódóképességének vizsgálatával. A jó kombinációk létrehozásához szükséges keresztezési partnerek kiválogatásához, értékeléséhez Szegeden használtak őszi búzában diallél keresztezést. Az új biometria eljárással igen hamar elkezdtek a főkomponens analízis és a főkomponens regresszió búzanemesítésben való kipróbálását is, a minőségi tulajdonságok közötti kapcsolatok feltárására pedig a klaszter és faktor analízis alkalmazását. Szegeden foglalkoztak az aestivum búzák minőségének genetikájával is, továbbá a szárrozsd rezisztencia vizsgálat új módjainak kifejlesztésével is.

7.2. A minőségi tulajdonságok megváltoztatása a búzában

A hazai búzatermesztés világpiaci jelentősége marginális; a világpiac földrajzi kiterjedése olyan szerkezetű, hogy a szállítási költségek miatt az exportálható felesleg elsősorban Európában helyezhető el. Az Európai Unió piacán csak a kiváló minőségű búzában van létjogosultsága. A búza minőségét különböző tényezők befolyásolják: az agrotechnikai tényezők, az ökológia, ezen belül az évjáráthatás és a biológiai alap. A környezeti tényezőkön belül a legnagyobb jelentőséggel az évjáráthatás bír, tehát az adott év időjárása. Egy-egy évjárat az egész tápanyagfelvételt és beépülési folyamatot alapvetően befolyásolja, ezért hatása jelentős; például a kiváló sütőipari minőségű búzák jellemzőit is nagymértékben ronthatja. Minden egyes agrotechnikai tényező közvetlen (trágyázás) vagy közvetett módon (vetés) hatással van a búza minőségére. Különösen a nitrogénellátásnak van jelentős szerepe, mivel a szükségesnél kisebb mennyiségű kijuttatásnál a termés kiesésén kívül rossz minőséghez is vezet. Az őszi búza fehérjetartalom szoros összefüggésben áll a nedves- és száraz sikértartalommal. Alapkérdés biológiai feltételként az, hogy milyen fajtát válasszunk, milyen a fajta potenciális minősége és stabilitása. Ha a hazai

búzatermesztés jövőjét a minőség és az intenzitás fogja megalapozni, minden egyes gazdálkodási elemet súlyozottan kell számításba venni, mint a termőhelyi adottságokat, műszaki–technikai felkészültséget illetve a gazdaságossági számításokat. Tehát az elkövetkezendőkben még fontosabb lesz olyan kiváló sütőipari minőséget adó, továbbá különböző évjáratokban, termőhelyeken ezt stabilan tartó fajták kiválasztása, amelyek a termelőknek s a kereskedőknek is kedvezőbb értékesítési lehetőségeket nyújtanak. A külső tényezők közül az évjáratnak van a legnagyobb hatása. Az időjárás nagymértékben befolyásolja a búza minőségét, a betakarításkor csapadékosabb nyár fuzárium fertőzést (mikotoxin), illetve esésszám csökkenést okoz, míg a túl száraz, május–június a sikértartalomra, a farinográfus értékre hat azáltal, hogy a vázfehérjék nem alakulnak ki. A minőség két jellemző mutatója, a sikértartalom és a farinográfus értékszám egyaránt függ az évjáratától, a műtrágyázástól, valamint a fajtától. Megállapításaik szerint az évjárat hatás, az évjárat x fajta és az évjárat x műtrágya kölcsönhatás szerencsétlen kombinációja esetén hiába volt megfelelő a fajta genetikai potenciálja és a tápanyagellátás szintje, minőség csökkenés következett be a búzatermesztésnél.

Az elmúlt időszakban jelentős ismeretanyag halmozódott fel a búza minőségéről, a tartalékfehérjék összetételéről, a liszt- és sütőipari minőségről. A búzaszem tartalékfehérjéi közül a tésztaipari és sütőipari minőség szempontjából legfontosabbak a nagy molekulatömegű glutenin alegységek.

A búza minősítések az importáló és a vásárló igényeit kell mindenekelőtt figyelembe venni. Magyarországon a siker és a farinográfus (valorigráfus) vizsgálatok alapján, másutt az alveográffal értékelik a búzák minőségét. Klaszter analízis segítségével csoportosíthatók a búza minőségi tulajdonságai, a fajtákkal és termőhelyekkel összefüggésben.

A minőségi tulajdonságok megváltoztatásának korszerű szelekciós változata a Bedő és munkatársai (1998) által kidolgozott „Eljárás eltérő nagy molekulásúlyú (HMW) glutenin összetételű vonalából összeállított búzafajta szelekciójára” című

szabadalom. Ugyancsak Bedő és munkatársai (2001) egy három fázisból álló rendszert dolgoztak ki a keményszemű búzák nemesítésére.

8. Kukorica (*Zea mays* L.) agrobiotechnológia

8.1. A kukorica genetikai bázisa

A hazánkban termesztett kukoricák genetikai bázisa a sajátos nemesítői célkitűzések és a génerózió következtében az utóbbi időszakban jelentősen leszűkült, melynek kedvezőtlen hatásai közismertek. A kukoricatermesztésben igen sok külföldi hibridet használnak, amelyek genetikai hátterét csak néhány beltenyésztett vonal alkotja. A genetikai variabilitást különböző mutagénekkel lehet növelni, illetve a hagyományos eljárásokon kívül biotechnológiai módszereket lehet alkalmazni.

A kukoricanemesítésben felhasználható genotípusok körének szélesítéséhez a mutációs nemesítési módszer alkalmazása nagy segítséget jelenthet. Indukált mutánsok felhasználásával a populáció génkészlete gyarapszik, ami a fajták formagazdaságában bekövetkezett elszegényedése miatt napjainkban egyre fokozottabb jelentőségű. A változékonyságot növelő mutáció segítségével olyan növénytermesztési szempontból kedvező vonalak szelektálhatók, amelyek a termesztési igényeket jobban kielégítő új hibridkombinációkat eredményeznek.

A nemesítési alapanyag diverzifikálása neutron sugárzással is megvalósítható. Az utóbbi időszakban a neutron besugárzás genetikai, növénynemesítéstani alkalmazása iránt megnyilvánuló fokozott érdeklődés azzal magyarázható, hogy ez a fizikai mutagén faktor igen nagymértékben hat az RNS–DNS struktúrára azáltal, hogy a besugárzás nyomán keletkezett radioaktív anyagok által kibocsátott sugárzások sűrűbb ionizációt okoznának az élő szervezetben.

A hazai génbanki tevékenység kezdete 1955-re tehető, amely további előrehaladást hozott a fajták vizsgálatában. Ebben az évben a földművelésügyi miniszter az Agrobotanikai Intézethez csatolta a tápiószelei Kísérleti Gazdaságot és ezzel egyidejűleg megindult a nagyüzemi fajtakísérletezés szervezése is. A fő cél a központi fajtagyűjtemény megszervezése, valamint a növény–fajtakísérletezés központjának kialakítása volt. Az így kialakított fajtagyűjtemény már működése első

évében 400 hazai és külföldi növénnyel rendelkezett. A gyűjtemény elsődleges célja az volt, hogy állandóan gazdagítsa a génállományt, lebonyolítsa a növényminták cseréjét hazai és külföldi viszonylatban, illetve kialakítsa és fejlessze a hazai génbankot.

A tápiószelei Agrobotanikai Intézet a gyűjteményes anyag génbanki kezelésének általánosan elfogadott tevékenységei (regisztráció, tisztítás, szárítás, csomagolás, tárolás) elvégzésén keresztül 893 növényfaj 68000 magtetele esetében végzi a magcsere, közreadás folyamatát a növénynevelés alapanyagainak biztosítása, illetve génmegőrzési tevékenység érdekében.

Világviszonylatban az első génbank 1959-ben alapult Fort Collinsban (Colorado, USA), ahol az Országos Magtároló Laboratórium génbanki intézetté történő átalakítását végezték el. Ezt követte 1963-ban az IRRI (Nemzetközi Rizskutató Intézet) Los Banos-i (Fülöp-szigetek) génbankká fejlesztése, majd ezután Izmirben (Törökország) a Mezőgazdasági Kutató Introdokciós Központ átalakítása és végül 1969-ben Bariban (Olaszország, Csíraplasma Laboratórium), Hiratsukában (Japán), Braunschweigben, Gaterslebenben (Németország, BAZ-Génbank) alakultak génbanki tevékenységet végző intézetek.

Az 1940-es évek végétől Fleischmann Rudolf, Szüllő Ferenc, Fridrich Béla, Papp Endre, Beke Ferenc, Somorjai Ferenc, Berzsenyi J. László tudományos igényességgel foglalkoztak államilag minősített szabadon elvirágzó fajták nevelésével, majd Tarnóci Herbert, Schüller Ferenc, Jánossy András és kortársaik által megkezdődött hazánkban a fellelhető tájfajták begyűjtése, amelyek az akkor termesztett szabadon virágzó fajtákkal együtt adták az időközben génbanki feladatok ellátására hivatott Tápiószelei Agrobotanikai Intézet hazai kukorica génbankját.

Indukált mutáció segítségével különböző fenotípusú vonalak hozhatók létre, amelyek morfológiai tulajdonságaik alapján kultúr, kultúr-bokros, teopod, corn-grass típusokba sorolhatók. Ezek a mutáns vonalak eredményesen használhatók fel a hibridelőállítási programokban.

A neutronsugárzás várható nagy genetikai affinitása miatt 1980 óta ezen sugárforrás kukoricanemesítésben történő egyre nagyobb mértékű felhasználására

került sor. A kísérletek során egyrészt amerikai hibridalapanyag (F_1), másrészt különböző beltenyésztett vonalak gyors neutronos vetőmagkezelését követően a szegregációt mutató állományok szigorú beltenyésztésére, genetikai homogenizálására és a legkedvezőbb agronómiai tulajdonságokkal rendelkező beltenyésztett vonalak kiválogatására kerül sor.

A genetikai homogenitás növekedése a biológiai háttér oldaláról a termésnövekedés akadályozójává vált, mert a hibridek ökológiai érzékenysége nagymértékben fokozódott. Ennek elkerülése érdekében genetikailag különböző hibridek termesztését javasolják a különböző éréscsoportokon belül. A különböző FAO csoportokban szükség van olyan, egymástól eltérő genotípusú hibridek nemesítésére, amelyek mennyiségi és minőségi tulajdonságai a korszerű növénytermesztés igényeinek megfelelnek. A cél megvalósítása érdekében a kukoricanemesítésben felhasználható alapanyagbázis szélesítésére van szükség.

Az irányított keresztezési programok megvalósításában a genetikai divergenciának is igen nagy jelentősége van a nemzetközi együttműködésben, amely segítséget nyújt az eredményes hibridkukorica nemesítés megvalósításához. A különböző kukoricanemesítési célok (tőszámsűrítéssel szembeni tolerancia, terméskomponensek és a minőség javítása) megvalósítására a távoli keresztezéseken és a rekurrens szelekción kívül a mutációs nemesítés is eredményesen felhasználható.

A mutagenézis sikeresen használható fel a szülői vonalak egyes kedvezőtlen bélyegeinek javítására és a fontos tulajdonságok hibridekbe történő bevitelére, értékes kémiai komponenseket tartalmazó mutánsok indukálására, a beltenyésztett vonalak kombinálódóképességének javítására, valamint rezisztens vonalak és hibridek előállítására.

Az előállított mutánsvonalak tesztelése során megállapították, hogy a kedvező GCA értékkel rendelkező vonalak szintetikus fajták előállítására, míg a kedvező SCA értékkel rendelkezők pedig a heterózis nemesítésben hibridek előállítására használható fel. További vizsgálataik alapján azt tapasztalták, hogy a mutáns vonalak a kiindulási vonalakhoz képest jobb kombinálódóképességet mutatnak.

8.2. A kukorica növekedése, fejlődése, kombinálódóképessége

A diallél rendszerek vizsgálata növénynemesítési szempontból igen fontos, hiszen ezáltal kaphatunk átfogó képet a különböző genetikai háttérű hibridek környezeti reakcióiról. Segítségével a mennyiségi jellegek, tolerancia fokok, környezeti alkalmazkodóképességek örökölhetősége értékelhető.

A növények és egyéb élőlények sejtjei, szövetei és szervei matematikai függvényekkel leírható módon gyarapodnak, növekednek. A növekedés és fejlődés folyamata biológiai rendszereknél általában genetikailag meghatározott folyamat. A környezeti feltételek többé-kevésbé módosíthatják ezeket a determinált folyamatokat. Már a század 30-as éveiben Lumer felhívta a figyelmet arra, hogy Pearl és Reed által publikált szigmoid függvény alkalmas a növekedési folyamatok leírására. A század ötvenes éveiben von Bertalanffy kutatási eredményei megerősítették Lumer elméletét, miszerint a növényi és állati fejlődésben a tömeggyarapodás kezdetben exponenciális, majd monomolekuláris vagy telítődési függvénynel jellemezhető. A növényi tömeggyarapodást (esetünkben a kukoricáét) többféle módon vizsgálhatjuk. A klasszikus megközelítés az, amikor a fotoszintézis általi szerves anyagképződésből levonjuk a légzés általi tömegcsökkenést. Ennek az egzakt fizikai megközelítésnek a legnagyobb problémája, hogy a szoláris energia kémiai energiává történő konverziója meglehetősen bonyolult biokémiai mechanizmusokon keresztül megy végbe, melyhez szükséges input adatok sok esetben nem állnak rendelkezésre, valamint mérésük nagy nehézségekbe ütközik. Ezért gyakran más utat választanak a kutatók a szárazanyag gyarapodás szimulálására.

A statisztikai módszerekkel történő szárazanyag tartalom becslésre szintén számos irodalmi utalást találhatunk. A többváltozós regressziós statisztikai vizsgálatokkal kapott eredmények sok hasznos információt tartalmaztak, viszonylag jól adták vissza a tömeggyarapodási görbe menetét, de olyan alapvető kiindulási feltételnek, mint a változók normális eloszlása és függetlensége sajnos nem tudtak maradéktalanul megfelelni. Még a dinamikus szimulációs modellekkel kapott

eredmények sem tudták kezelni a tömeggyarapodásban létrejövő szárazanyag csökkenést.

Növekedési függvényeket leggyakrabban a növény–időjárás analízis modellekben alkalmazzák, mert:

- alkalmazásuk segítségével a fotoszintézis és légzés folyamatának bonyolult számítási formulája figyelmen kívül hagyható,
- a különböző növényi részek növekedési dinamikája a teljes növekedési periódusban egyszerűen, zárt alakban megadott egy vagy több változós függvénykapcsolattal jellemezhető.

A növekedési függvények jellegükből adódóan nem veszik figyelembe a szárazanyagtömeg csökkenést. A tömeggyarapodási dinamika becslése pedig lényegesen javulna, ha a tömegcsökkenéseket is figyelembe tudnánk venni.

További problémát jelent, hogy növényi növekedés leírása során a szerzők rendszerint egy vagy csak néhány fajtát vizsgálnak, így az eredmények korlátozott felhasználhatóságot biztosítanak. Nagyon kevés az irodalmi utalás (akár hazai, akár nemzetközi viszonylatban), amely nem egyedenként, hanem teljes diallél rendszerben vizsgálja valamilyen modell segítségével – pl. az időjárási hatások függvényében – a növényi növekedési, fejlődési viszonyokat.

A vizsgálatok módszere és az alkalmazott változók tekintetében voltak és vannak is különbségek, azonban a legtöbb külföldi és hazai szerző egyetért abban, hogy mind a teljes növény, mind az egyes növényi részek tömeggyarapodása is jól közelíthető logisztikus görbével. A vetés és érés közötti növekedési folyamatra olyan növekedési függvényt kell illeszteni, mely eleget tesz mindkét feltételnek.

Az említett kritériumoknak leginkább a logisztikus növekedési függvény felel meg, amely szimmetrikus növekedési menetet feltételez. A Gompertz és a Chanter féle növekedési függvények esetében nem szimmetrikus a kezdeti és végső növekedési intenzitás. A természetben lejátszódó folyamatok Weyl szerint a szimmetriát részesítik előnyben, a tényleges körülmények gyakran torzítják a valóságban ezt a törekvést

irányt. Mivel azonban az utóbb említett függvények paraméterezése és illesztése bonyolultabb, így a vizsgálatok során logisztikus növekedési menetet szükséges feltételezni.

Mindkét fent említett problémára megoldást jelenthet, ha nem az átlagos szárazanyagtartalom-, hanem a maximum szárazanyagtartalom értékekre illesztünk logisztikus növekedési függvényt. Az így illesztett burkoló görbe az éghajlatilag lehetséges növekedési optimumot reprezentálja.

A növényi stresszhatás tömeggyarapodási vizsgálatokban való figyelembe vételével szintén több szerző végzett vizsgálatokat. A leggyakoribb megközelítési mód, amikor a vízstressz értékét növényi felszínhőmérsékleti adatok segítségével határozzák meg. A növényállomány felszínhőmérsékletéből parametrizált vízstressz-index valamint a nettó fotoszintézis szoros kapcsolata került megállapításra.

A növekedés analízis diallél rendszerbeli alkalmazása segítségével teljesebb képet kaphatunk a kukorica környezeti (meteorológiai és talajtani) tényezőkre adott reakcióiról és ennek genotípusos függőségéről. Az alkalmazott modell segítségével a növénytermesztők számára gyakorlatiasabb, szélesebb körben felhasználható információk nyújthatók. Alkalmazása segíthet feltárni a szárazságtűrés öröklődését, azaz kiválaszthatók azok a legjobb kombinálódó képességgel rendelkező szülői vonalak, amelyek F_1 hibrid utódai legkevésbé érzékenyek az utóbbi években többször is előfordult nyári szárazságra.

A kukorica nemesítési alapanyag diverzifikálása neutronsugárzással is megvalósítható. A sugárzás biológiai hatását az elnyelt dózissal jellemezzük, melynek jele: D. Mértékegysége a Gray, jele: Gy, az a sugárdózis, amelyet 1 kg tömegű anyag elnyel, ha vele állandó sugárzással 1 Joule energiát közlünk: $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$. A neutronsugárzás várható nagy genetikai affinitása miatt 1980 óta ezen sugárforrás kukoricanemesítésben történő egyre nagyobb mértékű felhasználására került sor.

Kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy a 30 Gy feletti dózisok teljes letalitást okoztak, így a kukorica nemesítésben a továbbiakban nem alkalmazhatók.

Élő, felnevelt növények csak az 5, 20, és 30 Gy besugárzási dózisok esetében kaptunk, a vetőmagelőállítás viszont csak az 5 illetve a 20 Gy dózissal kezelt növényeknél bizonyult sikeresnek.

Indukált mutáció segítségével különböző fenotípusú vonalak hozhatók létre, amelyeket morfológiai tulajdonságaik alapján a következő csoportokba sorolunk kultúr vonalak, kultúr–bokros vonalak, teopod–típus, corn–grass típus. A különböző mutagének felhasználásával a növények formagazdagsága jelentősen növelhető.

Gyors neutron, illetve ^{60}Co izotóppal, 15000 r sugárdózissal kezelt értékes gazdasági tulajdonságokkal rendelkező beltenyésztett kukoricatörzsek esetében a sugárzás különböző jellegű változásokat idézett elő a kukorica növényeken. Megállapításra került, hogy az egyes egyedek esetében a levélszám gyengén, a növénymagasság erősen mutabilis tulajdonságként szerepelt. A sugárkezelt vonalak keresztezésével létrehozott hibridkombinációk termőképessége, kukoricaüszög–rezisztenciája, tőszámsűrítetősége szignifikánsan jobb eredményeket mutatott a standard hibridekhez viszonyítva. A morzsolási % és a terméseredmény között pozitív összefüggés mutatkozott.

A termésátlagok további növelésének egyre inkább gátjává válik a hibridek genetikai uniformitásának növekedése, ezzel párhuzamosan a genetikai sebezhetőség fokozódása. A fajtaösszetétel kialakításánál egymáshoz hasonló fajták kerültek a szortimentbe. Megtörtént a beszűkülés a génalap területén, mert ezek szelektálása után kevés olyan vonal maradt meg, amely biztosíthatta volna a változékonyságot.

A genetikai homogenitás növekedése a biológiai háttér oldaláról a termésnövelés akadályozójává válik, mert a hibridek ökológiai érzékenysége nagymértékben fokozódik. Ennek elkerülése érdekében genetikailag különböző hibridek termesztését javasolják a különböző éréscsoportokon belül.

A diallél analízis a növénynevelésben alkalmazott kvantitatív genetikai módszer, amellyel egy populációban, vagy a kiválasztott szülőktől származó utódokban előforduló gének és a környezet hatását lehet becsülni.

Az értékelés matematikai módszerének két iskolája ismert: az amerikai Griffing, (1956) és az angol Hayman és Jinks. A diallél analízis lehetőséget nyújt részletes információ szerzésre az analizálandó formák más genetikai sajátságairól is. Többek között a gének additív hatásairól, azon gének dominanciájának fokáról és irányáról, amelyek a jellegek kifejlődését szabályozzák. Információt kaphatunk a domináns és recesszív gének gyakoriságának viszonyáról meghatározott lokuszban.

A nemesítési növényanyag genetikai szerkezetének ismerete alapvetően fontos a sikeres nemesítői munkához. A gazdasági szempontból fontos tulajdonságok legtöbbször környezeti hatások által befolyásolt poligénes determináltságú. Ezek hatása a mendeli szabályoknak megfelelően additív, illetve domináns és episztatikus jellegű.

Amikor az egyik vonal átlagos produktivitása nagyobb, mint a másiké, akkor valamennyi hibridjének az elemzésén alapszik annak megállapítása, hogy vajon ennek a vonalnak jónak tekinthető-e az általános kombinálódóképessége vagy sem. Abban az esetben, amikor egy szülő átlag fölötti produkcióval rendelkezik, akkor annak megállapítása, hogy a specifikus kombinálódó képessége jó-e, bizonyos utódai hozamának vizsgálatán alapszik. Hasonlóképpen csekély kombinálódó képesség is meghatározható.

A kombinálódóképesség eredményesen alkalmazható azon vizsgálati eljárások folyamán, ahol a vonalak teljesítményét kívánjuk tanulmányozni és összehasonlítani a hibridkombinációkban. Ezért igen nagy jelentőségű a Sprague és Tatum által megalkotott általános és specifikus kombinálódóképesség vizsgálata.

A mennyiségi tulajdonságokat a kukorica esetében nagyszámú gén (poligén) határozza meg. Hatásuk lehet recesszív, domináns, részlegesen domináns vagy overdomináns.

Beltenyésztett kukorica vonalak általános kombinálódó képességének diallél keresztezésekben való tanulmányozásakor megállapításra került, hogy az általános-, és specifikus kombinálódó képesség ismeretében a nemesítő könnyebben ki tudja választani azokat a szülőpárokat, amelyek azután nagy termőképességű hibrideket eredményeznek.

Magas heterózis hatás jelentkezett azokban a kombinációkban, ahol legalább a keresztezési partnerek egyike magas általános kombinálódó képességgel rendelkező vonal volt. A termést additív és nem additív genetikai hatások határozták meg. Meghatározott keresztezések esetén szignifikáns reciprok hatást igazoltak.

A diallél analízist széleskörűen használt nemesítési eszköz, amely értékes genetikai információt szolgáltat a kísérleti anyagról. A statisztikai módszerek a diallél rendszerekben elsősorban előrejelzésre használhatók és nem pedig a nemesítési anyag leírására.

A vizsgálatok eredményei alapján kimutatható, hogy a heterózis hatás a növényenkénti szemtermés előrejelzésében volt igen hatékony, míg a GCA értékek elsősorban az aktuális hibrid teljesítmény előrejelzésében használhatók fel.

8.3. A biotikus stresszekkel szembeni tolerancia/rezisztencia

A kukoricánál az utóbbi időszakban egyre inkább fontossá vált a biotikus stresszekkel szembeni tolerancia és/vagy rezisztencia. A kukorica vegyszeres növényvédelme a vegyszeres gyomirtásra korlátozódott leginkább, a megoldást a kártevőkkel és kórokozókkal szembeni rezisztencia jelentette. Annak érdekében, hogy a kukorica humán- és takarmányként történő hasznosítását a minőségromlás ne befolyásolja és a termelés jövedelmezősége se csökkenjen, ezért az ellenállóképesség kiemelkedő szerepet játszik.

A kukorica fuzáriumos megbetegedése hazánkban az 1960-as évek végétől jelentkezett és öltött járványos méreteket. A jelentős termésveszteség mellett számottevő hatást okozott a humánegészségügyben és az állattenyésztésben is világszerte a toxikózisok miatt. A betegség tünetei az egész tenyésztési időszakban megfigyelhetők. A kukorica termésbiztonságának egyik fontos tényezője a különböző betegségek okozta veszteségek megelőzése, csökkentése.

A kukorica betegségei közül – kórtani szempontból – a *Fusarium* fajok előfordulása lehet kihatással jelentős mértékben a terméseredményekre. A fuzáriumos megbetegedés bekövetkeztére és kimenetelére az adott genotípuson kívül a környezeti tényezők (csapadék, páratartalom, állati kártevők pl. kukoricamoly) is nagy szerepet

játszanak. Környezeti stressznek kitett állományban a fuzáriumos megbetegedések fokozódnak. A *Fusarium* fertőzöttséget és ezen keresztül a toxinszennyezettséget az évjárat, annak hőmérsékleti és csapadékviszonyai nagymértékben befolyásolják. A kukorica *Fusarium* fajokkal szembeni védekező készségét javítani tudjuk olyan törzsek létrehozásával, melyekben egyesítjük a kiváló hibridalkotó képességet a betegség ellenállósággal, amihez speciális genetikai alapanyag megtervezése, létrehozása szükséges. A fuzariotoxikózisokkal szembeni védekezés legjárhatóbb útja a megelőzés és legbiztosabb lenne a fuzáriumos fertőzöttség kialakulásának megakadályozása, de legalábbis a fertőződés mértékének csökkentése a növénynemesítők és növénytermesztők összehangolt munkájának segítségével. A kukorica mutációs kezelése során létrehozott vonalak betegség ellenállósága javulhat. Beltenyésztett vonalak és hibridjeik diallél keresztezését végezték el *Fusarium* fajok okozta betegségellenállóságra természetes (provokációs kísérlet nélkül) körülmények között. Szignifikáns hatásokat mutattak ki az általános és specifikus kombinálódóképességnél, negatív korrelációt a szemtermés és a fertőzött növények százalékos aránya között.

A **kukoricamoly** a mérsékelt égövi kukoricatermesztés legnagyobb kártevője, évente mintegy 1000 millió dollár veszteséget okoz a termelőknek a termés kiesés által. A kukoricamoly főleg a csemegekukoricában és a hibridvetőmag-előállításban okoz jelentős károkat. A fuzáriumos csőpenész kialakulása szorosan összefügg a kukoricamoly kártételével még a fuzáriumnak kedvezőtlen időjárási tényezők esetén is. A tejesérés időszakában kukoricamoly által megfertőződött növények szignifikánsan kisebb termést produkáltak az egészségeshez viszonyítva. A kukoricamollyal fertőzött tövek a gombabetegségek iránt is fokozottabban érzékenyek lettek és kutatásai alapján tényként közli, hogy a kukoricamollyal fertőzött, eldőlő száraz csaknem mindegyikén megtalálható volt a fuzárium, sőt az eseteknek átlagosan 22 %-ában a csővön is talált fertőzést.

Magyarországon a kukoricatermesztés a mezőgazdaság egyik meghatározó ágazata. Az utóbbi időben egyre jelentősebb károkat okoz a **kukoricabogár**

(*Diabrotica virgifera virgifera*), mely csökkentése a termelés jövedelmezősége szempontjából is fontos. A *Diabrotica* jelenléte elsősorban a nagymértékű és a vetésváltás nélküli termesztést veszélyezteti. Az amerikai kukoricabogár az USA-ban jelentős nagyságú károkat okoz, Európában a belgrádi repülőtér mellett okozott súlyos gyökérkártétel miatt figyeltek fel rá. Magyarországon és Horvátországban már 1995-ben megjelent. Hazánkban először a Jugoszláviával és Romániával szomszédos területeken jelent meg, és 2001 óta valamennyi megyében jelen van. Magyarországon egyre nagyobb területen fordul elő ennek köszönhetően a növénydőléssel járó kár. Az USA gyakorlatában egyre inkább megnőtt a kukoricabogárral szemben rezisztens transzgénikus kukoricahibridek jelentősége. Ezek az inszekticid használat elmaradása miatt kevésbé károsítják a környezetet, továbbá termésnövekedést mutatnak a nem génkezelt kukoricákhoz képest. Egyes kutatók a kukorica esetében a növényi rezisztencia kialakítását tartják a legfontosabbnak a kukoricabogárral szemben. Back-cross nemesítési programból származó kukorica vonalakat használtak fel a rezisztencia normál vonalakba történő átvitelére. A kukorica hibridek örökletesen különböznek a kukoricabogár kártétellel szembeni toleranciájukban, továbbá azon képességükben, hogy a biomassa a növények mely részében kerül felhalmozásra a kártétel következtében. A kukoricahibrideknél a lárvakárosítás hatására a fotoszintetikus ráta csökkent, amely a „lag” periódust követően a növénymagasság csökkenéséhez vezetett. A *Diabrotica virgifera virgifera* Leconte (*Chrysomelidae, Galeracinae*) lárvák hatását vizsgálták különböző európai kukorica hibridekre, melyek között nagyfokú variabilitást találtak. A szántóföldi károsodással kapcsolatos besorolás lehet az elsődleges teszt, mielőtt a kukoricahibridek rezisztenciájára vonatkozó megállapításokat meghozzuk. Szignifikáns korrelációt találtak az imágók száma, a gyökérkártétel és a termésveszteség mértéke között. Megnövekedett számú imágót találtak a kukorica után termesztett egyéb növényeknél is. A kukoricahibridek helyes megválasztásán kívül a vetésváltás és a megfelelő inszekticidek alkalmazása hozhat megfelelő eredményt. Dikulturában kisebb mértékű fertőzöttséget találtak a trikulturához képest. A kukorica gyökerét károsító lárvák szignifikáns mértékben

csökkentik a szemtermést, megváltoztatva a növények fotoszintetikus rátáját, limitálják a víz és tápanyagok felvételét, továbbá növelik a növények érzékenységét a megdőléssel kapcsolatban. A kukorica növények rezisztenciája az, amely a leghatékonyabb védelmet adja a kukoricabogárral szemben. A molekuláris genetikai technológiákban elért előrehaladás azt a potenciált rejti magában, hogy a konzervált és régi genotípusokból a rezisztencia gén a korszerű, termesztett típusokba introgresszióval átkerülhessen. A biotechnológia eredményeként az USA-ban megjelent a *Cry3Bb* toxin fehérjét tartalmazó transzgénikus kukorica hibrid, amely a lárvák elleni védekezésben adott jó eredményeket. Alternatívaként azonban a gyakorlat számára szükség van az imágók és lárvák elleni hatékony védekezésre is. A leghatékonyabb védekezési mód az integrált növényvédelem lehet, amelynek részeként kiemelhető a *Diabrotica* toleráns kukorica genotípusok nemesítése.

8.4. A kukorica hibridek műtrágya és növényszám reakciója

A kukorica hibrideknél a termésnövekedéshez a genetikai előrehaladás, az agrotechnikai innováció és a genetikai x agrotechnikai interakció egyaránt hozzájárult. A különböző kukorica genotípusok jól meghatározható optimum tartománnyal rendelkeznek az egyes agrotechnikai tényezők vonatkozásában, amely a maximális termés eléréséhez szükséges. A kukorica hibridek agronómiai reakcióinak ismerete hozzájárul a kukoricatermesztés hatékonyságának javításához.

A kukorica termésmennyiségét nagymértékben három tényező, a tápanyagellátás, a vetésidő és a tőszám határozza meg. A három tényező hatékonyságát befolyásolja az ökológiai és biológiai tényezők közötti igen szoros interakció is.

Az elmúlt időszakban a kukoricahibridek tőszám-sűrítetősége javult, az új hibridek már képesek tolerálni a magasabb növényszámot. A termésstabilitás függ a stressztoleranciától, amely általában véve javult a különböző genotípusoknál. Hazánkban széleskörű kutatásokat folytattak eltérő genotípusoknál, ökológiai viszonyok és évjáráthatás mellett a hibridek növényszám reakcióját illetően. Több kutatási eredmény rávilágított arra, hogy a hibridek optimális tőszáma nem csupán a

tenyészedő hosszától, hanem elsődlegesen a genotípustól függ. Bizonyos hibridspecifikus értékeken túl a tőszámsűrítés fontos szerepet játszott a termésnövekedésben. Ugyanakkor arra is felhívja a figyelmet, hogy a túl sűrű, vagy túl ritka növényállomány alkalmazása egyaránt terméscsökkenéshez vezet. Az optimális növényszám a hibrid sűríthetőségén kívül elsősorban a víz- és tápanyagellátottság kérdése. Több szerző óvatosságra int a tőszámsűrítéssel kapcsolatban, mivel a túlzott sűrítés vízhiányt indukál. Öntözéses termesztésben a növényszám tényező felértékelődik. Berzsényi szerint azonos genotípusok esetén csapadékos évjáratokban 80 ezer tő/ha, míg száraz évjáratokban 50 ezer tő/ha volt az optimális növényszám. Az aszályos évjáratok gyakoriságának növekedésére tekintettel a korábbi 80–90 ezres hektáronkénti növény számmal szemben a FAO 200–300-as hibrideknél 68–72 ezer, míg a FAO 400–500-as hibrideknél 60–65 ezer termő tő/ha-t javasolt.

Napjaink modern genetikai szerkezetű hibridjei kedvezőbb forrás-felhasználási hatékonysággal rendelkeznek, mint a régebbiek. Az új típusú hibridek magasabb műtrágya szintekre adtak kedvezőbb termésreakciót, mint a régebbi típusúak. Hazánkban igen sokan foglalkoztak különböző ökológiai körzetekben, különböző kukorica hibrideknél, különböző évjáratokban a műtrágya reakció kérdéskörével. A műtrágyázás tervezésekor a terméssel kivont tápelemek mennyiségéből kell kiindulni. A hatékonysági és környezetvédelmi szempontokat figyelembe véve a kukoricánál a legkedvezőbb N-adag 60–120 kg/ha réti talajon előveteménytől és évjáratától függően. A kukorica biomassa produkciójának maximuma és abszolút növekedési sebessége N 160 és N 240 kg/ha-os kezelésben volt a legnagyobb. A kukorica teljes vegetáció alatt felvett tápanyagmennyisége 11 t/ha-os szemtermés esetén N 264, P₂O₅ 110 és K₂O 264 kg/ha. A terméstöbbletek eléréséhez elsősorban a nitrogénnek van meghatározó szerepe. A nitrogén érvényesülését a talaj tulajdonságai, a növényfaj és a hibrid sajátosságai, valamint az ökológiai tényezők szabják meg. A nagyobb műtrágya szint mellett, hogy nagyobb termés elérését teszi lehetővé, ugyanakkor kedvezőtlen esetekben a negatív hatásai is nagyobbak lehetnek.

A fajtaspecifikus kukoricatermesztési technológia fontos eleme az optimális tőszám adott hibridre történő meghatározása és adaptálása. A hibridnek nemcsak az optimális tőszámát, hanem a tőszámoptimum–intervallumát is determinálni kell és a termesztés során ennek az alsó értékét kell alkalmazni.

Kevesen foglalkoztak a tápanyag visszapótlás és a növényszám együttes vizsgálatával. Az említett két agrotechnikai faktor csak az összes termesztési tényezővel összhangban tervezhető meg szakszerűen. A kedvező genotípusú hibridek jó töhiány–kiegyenlítő képességgel rendelkeznek, továbbá képesek a tőszám sűrítésből keletkező károk kivédésére is. A tőszám plasztikusságot akkor aknázhatjuk ki, ha a kukorica növény rendelkezésére álló tenyészterület csökkenésével párhuzamosan növeljük a kijuttatott N–műtrágya mennyiségét is.

8.5. A kukorica minőségének szerepe, jelentősége és megváltoztathatósága

A kukoricahibridek vonatkozásában, a korábbi időszakban a meghatározó szempont a termésmennyiség volt, ami a minőség romlásához és háttérbe szorulásához vezetett. Ma már azonban a kukorica sokirányú felhasználhatósága következtében ez egyre inkább előtérbe került, ami a hagyományos minőségi tulajdonságok, az ásványi elemek és a biokémiai jelegek javítását egyaránt magában foglalja.

A kombinálódó képesség és a minőség együttes vizsgálata a termés és a minőség negatív korrelációját minimálisra csökkenti. Az eljárás a vizsgált hibridek esetében eredményesebbnek mutatkozott a hibridek minőségének javítására a többi, kukoricanemesítésben alkalmazott módszerhez viszonyítva.

A mutáns vonalakkal előállított hibridekben a termésmennyiség növekedése ne járjon együtt a minőség romlásával. A kísérletek eredményei alapján megállapításra került, hogy az egyes vonalak kombinációs értéke, fehérje és lizin tartalma között nincs megbízható összefüggés. A fehérje–lizin, valamint a fehérje és az olajtartalom között negatív kapcsolat állt fent.

A kukorica különböző mutációs módszerekkel létrehozott beltenyésztett vonalai jelentős szerepet játszanak az állami minősítésre kerülő hibridek esetén. A mutánsvonalak kedvező minőségi tulajdonságai az általuk létrehozott

hibridkombinációkban is megnyilvánulnak. A nemesítési módszer megválasztása, a genetikai analízisek elvégzése nagymértékben javítja a szelekció hatékonyságát és jelentős mértékben hozzájárul a kukorica minőségi tulajdonságainak javításához. A nemesítésben, a mutáció mellett, több alternatíva is létezik a beltartalom javítására; a biológiai, ökológiai, termesztési tényezőket, a fenntarthatóságot együttesen kell figyelembe venni a minőség megítélésénél.

A kukorica minőségi tulajdonságainál a variabilitás fokozásában igen nagy jelentősége van az indukált mutációs nemesítésnek. Igen sok kutató vizsgálta azt, hogy a magas fehérjetartalmú szülői formáknál a vonalkiválogatás eredménye milyen mértékben realizálódik az F_1 hibrid nemzedékben. Egyesek szerint a mutáns vonalakkal előállított hibridkombinációk termésszintje elérte a standard szintjét, fehérjetartalma pedig meghaladta azt. Ezzel ellentétben mások kutatási eredményei azonban azt mutatják, hogy a fehérjetartalom növelése a termőképesség csökkenésével jár együtt. Egyes esetekben a hibridek fehérjetartalma a szülői vonalak fehérjetartalmához viszonyítva kevesebb. A teljes szem, a levél és a szár nyersfehérje-tartalma a hibridekben köztes helyet foglal el a szülői formákhoz viszonyítva.

A hibridek fehérjetartalmát a jelenlegi szinthez viszonyítva csak magas fehérjetartalmú (17–18 %) beltenyésztett vonalak felhasználásával tudjuk növelni. Mivel a fehérjetartalom és a termés között nincs szignifikáns korreláció, ezért ígéretesnek tűnik a korrelációtörő egyedek kiválogatásával a nagy fehérjetartalmú és termőképességű hibridek előállítása. A hibridek minőségének perspektivikus javítására a vonalak kombinálódó képességének változását és a szülőpárok fehérjetartalomra történő kiválogatását együtt kell vizsgálni. Az egyes mutáns vonalakat a gyakorlati nemesítési munkában a beltartalomra történő nemesítésnél (kémiai összetevők javításánál) lehet eredményesen felhasználni.

A minőség javítására irányuló kukorica nemesítés egyik lehetséges útja a vonal és fajta analógok előállítása, amelyek az ígéretes hibridek szülői alakjai lehetnek; a másik út új vonalak és hibridek előállítása a *Zea mays* L. faj széleskörű genetikai

variabilitása alapján; a harmadik pedig magas fehérjetartalmú hibridek előállítása opaque-2 mutáns alkalmazásával.

Minden növény fiziológiai igénye, hogy ásványi elemeket vegyen fel abból a közegből, amelyben él. Vannak növények, melyek bizonyos ásványi elemekből különösen sokat igényelnek, ennek megfelelően többet is fogyasztanak belőlük. Egyes növényi részekben kimutathatók olyan ásványi elemek is, melyek a mai ismereteink szerint szükségtelenek a növények számára, sőt mérgezők is lehetnek. A fiziológiai igény számos tényezőtől függ és ezt a gyakorlatban a fajok és a fajták környezetigényével hozhatjuk összefüggésbe. A magasabbrendű növények, a káliumból ézerszer többet vesznek fel, mint bórból. De nincs mindig ekkora különbség, a vas (Fe) és a mangán (Mn) gyakran azonos mennyiségben szükséges, ezért fiziológiai szempontból a vasat átmeneti elemnek soroljuk a makro- és mikrotápelemek közé.

A kukorica vonalak és hibridek ásványi elem tartalmának vizsgálata – a táplálékláncban betöltött szerepe miatt – napjaink aktuális feladata. Az agrotechnikai tényezők (műtrágyázás, öntözés, vetésváltás) befolyásolják a kukorica átmeneti és toxikus ásványi elemtartalmát. Az említett temesztéstechnikai faktorokon kívül a hígtrágyával kezelt talajokon is eltéréseket tapasztalt a mikroelem tartalomban a kontrollhoz viszonyítva. A növény–talaj rendszerben, az esszenciális és nem esszenciális elemek körforgalmát vizsgálva értékes információkhoz juthatunk a talajokból kivont elemek mennyiségét illetően. Mutációval létrehozott beltenyésztett kukoricavonalak teljes diallél rendszerében a legszembetűnőbb a nitrogéntartalom változása volt a tenyészedőben a különböző növényi részek beltartalmi értékei közül.

A növényanalízis a növény mezőgazdasági szempontból lényeges bármely tulajdonságának a vizsgálatát jelenti. Ez lehet valamely növényi rész tömegének, színének, formájának, szerves és/vagy szervetlen komponensének mérése. A gyakorlati agrokémiában növényvizsgálatokon a növények kémiai analízisét, ezen belül is az ásványi elemek mennyiségének a meghatározását értjük. Az egyes elemek

koncentrációja, valamint a növényi szövetekben való eloszlása a környezeti tényezők és a genotípus függvényében változik. Az egyes, növényekben előforduló elemek lehetnek *nélkülözhetetlenek* (esszenciálisak), más elemek viszont csak *serkentőleg* hatnak, egyes nehézfémek pedig főleg nagyobb koncentrációban, vagy adott környezeti feltételek esetén *toxikusak* is lehetnek.

A növényelemzések egyik legfontosabb célja a termésveszteség elkerülése. Minimum 14 ásványi elem szükséges a növények zavartalan növekedéséhez, fejlődéséhez. Ezek közül a N, P, K, S, Ca és a Mg makroelemek, a B, Cu, Fe, Mn, Mo, Na, Zn és a Cl nyomelemek. A 14 felsorolt elemen kívül, a Co, Se, I, F, Ni, V, Si, Al és a Cr nem esszenciálisak a növény növekedéséhez, viszont közvetve hatnak a termés mennyiségére vagy az emberek, állatok egészségére. Adriano a növény szempontjából esszenciális elemek közé sorolja a B, Co, Cu, Mn, Mo, Se, V és Zn elemeket. A fentiekén kívül az Ag, As, Ba, Be, Bi, Cd, Cr, F, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, Ti, Tl és W elemeket viszont toxikusnak vagy csak az állatok számára esszenciálisnak minősíti.

A ma, vagy a jövőben termesztett növényfajaink és fajtáink genetikailag rögzített és a termőhely, valamint a környezeti tényezők által meghatározott termelési potenciálját csak akkor tudjuk érvényre juttatni, ha folyamatosan biztosítjuk, illetve pótoljuk a vizet és az ásványi anyagokat. A növények kellő, vagy elégtelen ellátottsága azonban nem egyedül a talaj tápanyag–szolgáltató képességétől függ. Ezek mellett a növények – fajtól és fajtától függően változó – tápanyag–felvételi és tápanyag transzlokáló képessége is befolyásolja a tápanyag ellátottságot. Már régóta ismert volt, hogy a növényekben jellegzetes elváltozások következnek be, ha valamely tápanyaggal nincsenek kellőképpen ellátva. A jó tápanyagellátottságot, az élettani folyamatok hatékony működését az ásványi elemek növényi részekben jelenlevő megfelelő szintje mutatja.

Az állati szervezet ásványi anyag forgalmában résztvevő mintegy 40 elemet három nagy csoportba oszthatjuk. A makroelemek csoportjába sorolható a Ca, P, Mg, K, Na, S, Cl. Mikroelemekhez tartoznak a I, Fe, Cu, Zn, Co, Se, Mo, Ni, Mn. Az ultramikroelemeknek a következők: F, Cr, Li. A mikroelemek, ha nagyon kis

menyiségben is, de az életfolyamatok zavartalan lefolyásához nélkülözhetetlenek. Ha a táplálékból hiányoznak, hiánybetegségek lépnek fel.

A bór főleg bórsav és borát alakban fordul elő a talajban. A bór (B) felvehetősége a pH-érték emelkedésével csökken. Bőséges bórellátás esetén a levélcsúcsokban halmozódik fel, ez esetenként toxikus is lehet, és a levélszélek torzulnak. A bór legfontosabb funkciói a következők: fokozza a légzést, segíti a szerves molekulák diffúzióját a sejthártyákon keresztül, kedvezően hat az auxin-anyagcserére, a reproduktív szervek fejlődését és megtermékenyülését serkenti.

A mangán (Mn) a talajban két, három vagy négyértékű alakban fordul elő. A különböző értékű mangán (Mn) vegyületek közötti egyensúly a talaj redoxpotenciáljától függ. Felvehetőségét elősegíti a talaj pH-értéke, mikroorganizmusok tevékenysége és a vízellátás. Szabályozza a víz fotolízisét a fotoszintézis mechanizmusában a keletkező OH-csoportok megkötésével, mangán (Mn) porfirin vegyület keletkezik, amely részt vesz az oxigén (O_2) felszabadításában, aktiválja a peroxidáz légzési enzimet, fokozza az auxin hormon indol-ecetsav oxidációját.

A réz (Cu) a talajban kétértékű alakban (Cu^{2+}) fordul elő. Erős kötődése következtében nehezen mozog a talajban. A magasabb szervezettségű növények rézszükséglete általában csekély. Mozgékonyága a növényekben is minimális. A légzési enzim (polifenol-oxidáz) és C-vitamin (aszcorbinsav-oxidáz) komponense, fokozza a fehérjékben az aminosav-szintézist és a nitrogén megkötését, megóvjaa a klorofillt az idő előtti elbomlástól.

A vas (Fe) a növények szárazanyagában rendkívül kis mennyiségben fordul elő. A talajban, mint rácsba beépült elem található. A vas kelát-komplexeket alkot, valamint vegyértékváltozásra képes (Fe^{2+} , Fe^{3+}). E két tulajdonságán sokféle fiziológiai hatás alapul. Része a kloroplasztnak és a sejtmagnak, alkotója a ferredoxinnak (vas és kéntartalmú fehérje), a légzési láncban a citokrómok nélkülözhetetlen része, a peroxidáz és kataláz is vas-tartalmú enzimek.

A stroncium a kalciummal szinte azonos módon metabolizálódik. Emellett a kalciummal azonos élettani folyamatokba kapcsolódik be (pl. vérárvadás).

A cink (Zn) különböző agyagásványok (biotit, amfibol) kristály rácsaiban fordul elő. A termőtalaj felső rétegében található. Ha a talaj foszfáttartalma magas, csökkenti a cink (Zn) felvételét. A növények cink igénye általában kicsi. A növényen belül a sók foszfáttartalma gátolja a cink (Zn) transzportját. A cink (Zn) egyes enzimeket aktivál (*enolázt*, *glutaminsav dehidrázt*), szabályozza a nitrogén (N) anyagcserét, az indolecetsav (*auxin*) szintézisében fontos szerepe van.

8.6. *In vitro* és konvencionális eljárások integrációja a kukoricánál

Az *in vitro* eljárások nem helyettesíthetik a konvencionális módszereket, azonban értékes kiegészítői lehetnek azoknak. A növényregeneráció szövetkultúrák segítségével egyre növekvő mértékben megszokott eljárássá válik olyan egyszikű növények esetében, mint a kukorica. Az *in vitro* eljárások kivitelezhetősége és a regenerációs képesség csökkenést mutat a homozigóta szint emelkedésével, ami arra utal, hogy az előzőekben említett tulajdonságok elsődlegesen domináns génhatások által befolyásoltak. Számos *in vitro* eljárás olyan szintet ért el, hogy azokat már a mindennapi gyakorlatban is fel lehet használni, továbbá az alkalmazási lehetőségek szinte kimeríthetetlenek.

Minden beltenyésztett vonal képes kalluszképzésre, de a friss kallusz tömeggyarapodás függ a különböző genotípusoknál az embriók érettségétől és a vizsgálat évétől. A beltenyésztés szintjén szoros negatív korreláció van a kallusz tömege és szemtermés nagysága között ($r = -0,811$). Pozitív korrelációt találtak a kallusz tömeg és a levélterület között ($r = 0,729$). Szignifikáns különbséget tapasztaltak a kallusz növekedésében a beltenyésztett vonalak és hibridjeik között. A kukorica kallusz tömeggyarapodása szempontjából, nagy variabilitást mutatnak az eltérő genotípusok kalluszképződései. A szakirodalmak eltérő hőmérsékleti értéket ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ot BUHINIČEK *et al.* 1994a; illetve $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ -t DUNCAN és WIDHOLM, 2004) tartottak optimálisnak a kallusz kultúrák képződésénél. Különböző genotípusú kalluszkultúrák fenotípusos megjelenései eltérőek lesznek a kiindulási anyagétól. A beltenyésztett

vonalak kallusz súlygyarapodásának általános kombinálódóképessége (GCA) függ az alkalmazott becslési módszertől, a szemtermés eredményénél nem volt szignifikáns különbség.

Az elmúlt évtizedben és napjainkban a mezőgazdaság számára a legnagyobb kihívást a növényvédelem szakszerű, hatékony végrehajtása jelenti. A ma alkalmazott gyomirtó szereink hatékony alkalmazása is nagyon jelentős elméleti és gyakorlati felkészültséget igényel; az alkalmazás időpontja, helye, módja, a herbicidek formája, az azt tartalmazó készítmény, vivőanyag, tapadószer jellemzői fontos szempontok a jó hatásfokú, továbbá a környezet- és fogyasztóvédelmi előírásoknak is megfelelő gyomirtásban. Emellett néhány gyomfaj ellenállóságot (rezisztenciát) mutat egyes herbicidekkel szemben. A közelmúltban előtérbe kerültek nagy hatásfokú, széles spektrumú és a környezetben viszonylag gyorsan inaktívvá váló vagy lebomló herbicidek, amelyek viszont legtöbbször sajnos a kultúrnövényt is károsítják. Azonban ezek a szerek az egyes növénycsoportokra jellemző speciális anyagcsere utak bizonyos lépéseire hatnak gátlón, így már többé-kevésbé specifikus spektrummal jellemezhetőek.

A herbicidek kultúrnövényekre kifejtett káros hatásának megelőzésére megoldást az azokkal szemben rezisztenciát mutató fajták/hibridek nemesítéssel történő előállítása jelenthet. E nemesítési módszerek szintén jelentős fejlődésen mentek keresztül. A hagyományos módszerek (direkt szelekció a kívánt jellegekre szabadlevirágzású rendszerekben, beltenyésztés önmegporzással, hibridek előállítása keresztporzással) mellett megjelentek a biotechnológia, illetve a molekuláris biológia új eredményeit felhasználó eljárások. Az egyre újabb eljárások a közeljövőben elvileg korlátlan lehetőségekkel kecsegtetnek, melyeknek egyelőre a környezetvédelmi, fogyasztóvédelmi és etikai jellegű előírásokat is tartalmazó nemzetközi megállapodások, illetve az egyes országok törvényei szabnak korlátokat.

Bár a biotechnológia új és legújabb módszereit hazánkban jelentős nemzetközi elismeréssel bíró kutatócsoportok kutatásuk eszközévé teszik, s ezek gyakorlati alkalmazása elterjedt, az eredmények mindennapi gyakorlati használatba történő

átültetését a hazánkban jelenleg hatályban lévő rendelkezések egyelőre nem teszik lehetővé. Ezen megfontolásokból a hazai növényvédelem a gyomirtás problémáját a hagyományos növényi biotechnológia oldaláról közelíti meg. Jelenleg tehát hazánkban a gyakorlatban a széles spektrumú, a környezet- és fogyasztóvédelmi előírásoknak megfelelő herbicidek alkalmazása, s az ezekkel szemben toleráns vagy rezisztens elit vonalak illetve hibridek hagyományos biotechnológiai eszközökkel történő előállítása a cél, mind a nemesítéshez és termesztéshez szükséges genetikai bázis gyarapítása, mind a termesztésbe vonható fajták számának növelése érdekében.

A szomaklonális variabilitás a növényi szomatikus sejtek *in vitro* kultúráiból regenerált növények ivaros utódai között kimutatható genetikai különbségeket jelenti. Mivel az *in vitro* tenyésztett sejtek kikerülnek a szervezet korrelatív hatása alól, jelentősen megnő a genetikai változások bekövetkezésének valószínűsége, s az ilyen heterogén tenyészetekből redifferenciálódással a sejtszintű variabilitás egyed szintre emelkedik. A szomaklonális variabilitást kiváltó okok két csoportot alkotnak: kromoszómális változások (kromoszómaszám-változások és kromoszóma-átrendeződések) illetve molekuláris változások (DNS metiláltságának változása, génmutációk, génamplifikáció és mozgékony genetikai elemek). A totális herbicidekkel szembeni ellenállóságot mutató genotípusok nemcsak szabad földön jelenhetnek meg, hanem hatékonyan szelektálhatók a sejt- és szövettenyészetben megjelent szomaklónok közül is. Az *in vitro* herbicid-szelekció azért került az érdeklődés középpontjába, mert a gyomirtószerekkel szembeni ellenállóság egyike azon sajátosságoknak, amire megbízhatóan lehet sejtszinten szelektálni, s az így kialakuló genotípusoknak potenciális agronómiai jelentősége van.

KÁDÁR (2001) felsorolása alapján a herbicideknek 16 csoportja van, melyek közül az ún. „B” csoportot alkotják az acetolaktát-szintetáz működését gátló herbicidek. Ebben öt alcsoportot képeznek az egyes vegyületszármazékok (szulfonil-karbamidok, imidazolinonok, pirimidinil-oxo-benzoátok, triazolpirimidin-szulfonanilidok, piridin-dikarbonátok), melyek mindegyike levélen és gyökéren keresztül felvehető szisztémikus herbicid.

Az imidazolinon- és szulfonilurea-származék hatóanyagok az acetolaktát-szintetáz (ALS – valin- és leucin-szintézis), illetve acetohidroxi-ecetsav-szintetáz (AHAS – izoleucin-szintézis) enzimet gátolják, az első enzimet, amely a valin, leucin és izoleucin szintézisében részt vesz, aminek következtében a merisztéma régiók növekedése leáll az aminosavak hiányában. Először a sejtek pusztulnak el, majd a növény is. Mivel az enzim a kloroplasztiszbán található, a vegyszerek csak akkor fejthetik ki hatásukat, ha a növények már működő kloroplasztisszal rendelkeznek; egyszikűek esetében a koleoptil felnyílásakor, kétszikűekben pedig kétleveles fejlődési stádiumban.

A herbiciddel szembeni ellenállóságnak két esetét különböztetjük meg, a rezisztenciát és a toleranciát, amelyek közti különbségek nem mindig voltak teljesen tiszták a kutatók előtt sem. Míg HOLT és LEBARON (1990) a rezisztenciát még a tolerancia egyik extrém, de ritka eseteként, GRESSEL (2002) a rezisztenciát már domináns monogénes, a toleranciát pedig poligénes jellegnek tartja. DE PRADO és FRANCO (2004) szerint a legelterjedtebb rezisztencia-típus a célhely (a hatás helye) mutációja. Emellett gyakran előfordul a gyomirtó metabolikus úton történő lebontása. Ritkább esetek a herbicid felvétele vagy szállítása mechanizmusának megváltozása illetve a gátolt célfehérje túltermelése, mely utóbbi más gének (génduplikáció, fokozott transzkripció) változásának eredménye.

Az imidazolinon-rezisztencia egy kevésbé érzékeny acetolaktát-szintetáz jelenlétének köszönhető, bár más herbicidekkel szemben ellenálló növényekben kialakulhat keresztrezisztencia acetolaktát-szintetáz inhibitorokra a citokróm p450-monooxygenáz fokozott detoxifikációján keresztül. Az imidazolinon rezisztenciának számos oka lehet, a leggyakoribb és legfontosabb azonban az acetolaktát-szintetáz kódoló gén fentebb említett mutációja, amely a célfehérje egy, a vegyületre nézve csökkent affinitással rendelkező változatához, ezen keresztül rezisztenciához, esetleg más, az acetolaktát-szintetáz gátló herbicidekkel szembeni keresztrezisztenciához vezet, s amely a többi vegyszercsalád esetével szemben viszonylag elég gyorsan alakul ki. A Du Pont szabadalmában hét olyan helyet (bázist) jelöl meg az acetolaktát-

szintetáz kódozó génben, melynek esetleges változása következtében a fehérje meghatározott helyén fellépő aminosav-csere rezisztenciát eredményez.

Az első imidazolinon herbicideket (imazaquin, imazetapir) szójában használták az USA-ban, melyre nézve ezek a vegyszerek szelektívek. Kukoricában is igen hatékonyak, de ez esetben nem szelektívek. Szelekció a rezisztens kukoricavonal előállítására 1982-ben kezdődött, az első ellenálló vonal az XA17 volt, mely azonban csak homozigóta formában mutatott teljes ellenállóságot. Az XI12 már heterozigóta formában is teljes értékű volt ilyen szempontból. Hazánkban 1996-ban kapott elismerést a Marista SC IR (imidazolinon-rezisztens) változata, melyet azóta még néhány IMI-nek nevezett hibrid köztermesztésbe kerülése követett: PR 37M81 IMI hibridek (Pioneer), Dekalb 471 IMI (Monsanto), Furio Sumo illetve Occitan Sumo (Syngenta) és Hypnos CL illetve Horus CL (Advanta).

A korábbi vizsgálatok a különböző növényfajoknál elsősorban a fajtaspecifitás megállapítására korlátozódtak, mivel az eltérő kémiai hatóanyagú gyomirtó szerek különböző stresszhatást váltanak ki az egyes genotípusoknál.

Bármilyen jó hatást is érhetünk el azonban ezekkel a szerekkel, nem hagyhatjuk figyelmen kívül azt a növekvő veszélyt napjainkban, hogy a rezisztenciagén hibridizáció során átjuthat a termesztett növények gyom jellegű rokonaiba. A probléma nem mai keletű. Ezt jelzi RYAN (1970) megállapítása, miszerint a triazinok 1950-es években történő bevezetése után kevéssel, nem sokkal a hatvanas évek vége előtt már közölték az első rezisztencia esetet. Az első ALS-inhibitor-rezisztenciát mutató gyomot, a *Lolium rigidum*-ot pedig HEAP és KNIGHT fedezte fel 1982-ben Ausztráliában, majd MALLORY-SMITH és munkatársai 5 évvel a klórszulfuron kereskedelemből bocsátása után, 1987-ben a *Lactuca serriola*-t. A jelenséget eddig többek között *Beta vulgaris*, *Brassica napus*, *Avena sativa*, *Sorghum bicolor*, *Helianthus annuus* és *Triticum aestivum* esetében is leírták. 2002-es felmérésének eredményei szerint a számontartott 257 herbicid-rezisztens gyom közül még 71 ALS gátlóval szemben ellenálló – így ez a legnagyobb herbicid-rezisztens „gyomcsalád”, de HEAP 2004-ben már több mint 80 esetet közölt.

Hazánkban 1976-ban észlelték, 1978–79-ben leírták a gyomnövények herbicid-rezisztenciáját. Az első rezisztens gyomnövénytípusok Bábolnáról és környékéről, a monokultúra bölcsőjéből kerültek ki: triazin-rezisztens *Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus chlorostachys*, *Chenopodium album*. A probléma megoldására ekkor már azonnal születtek is hatékony eljárások. 1979-ben pedig Komárom–Esztergom megyei szőlőültetvényekben atrazin-rezisztens *Conyza canadensis*-t, majd Bács–Kiskun megyében ugyanezen faj karbamid-származékokkal és paraquat-dibromiddal szembeni ellenálló változatát is megtalálták. Imidazolinon-rezisztens gyomot Magyarországon 2001-ig még nem találtak, de a szintén ALS-gátló szulfonilureára rezisztens *Cirsium arvense*-t leírtak. A hazai beszámolók többsége atrazint említ.

Nemcsak egyszerű rezisztenciát ismerünk azonban, s ez még tovább fokozza a nehézségeket napjaink gyomirtásában. Megkülönböztetjük a keresztrezisztenciát, amikor is a gyom több herbicidre rezisztens egyidejűleg, melyek ugyanazon helyen hatnak, és többszörös rezisztenciát, amikor a populáció két vagy több, különböző helyen ható herbiciddel szemben ellenálló.

A gazdaságokban fennálló folyamatos vegyszerhasználat és azok reziduális jelenléte maximális szelekciós nyomást képez a herbicid-rezisztencia kialakulásának és fennmaradásának irányába, így maximálisra növelve az evolúciós rátát is ebben a környezetben. Mindezek ellenére a legtöbb eset eddig csak az egyes régiókban endemikus probléma.

Sikeres növényregenerációt szövetkultúrákkal a kukorica (*Zea mays* L.) esetén GREEN és PHILLIPS 1975-ben hajtott végre éretlen embrióból származó szövetekkel. A növényi regenerálás organogenezis segítségével történik, de növényregeneráció szomatikus embriogenezis révén is végbemehet. Az egyszikű növények (többek között kukorica) regenerációja szomatikus embriogenezissel elsődleges kalluszból kevésbé tisztázott és az előrehaladás ezen a területen meglehetősen lassú.

A regeneráció mindkét típusa, fehér vagy sárga kalluszból indul ki, amely különbözik a granuláris, szürkéssárga, áttetsző kalluszoktól, amelyek nem képesek

regenerációra. Következésképpen a regeneráció szempontjából kompetens kalluszk vizuális szelekciója olyan módszer, amely lehetőséget ad a növényregenerációs képesség detektálására és fenntartására a kukorica szövetkultúrákban.

Kukorica szövetkultúrákból való növényregenerációt főképpen éretlen embrió eredetű kalluszkokból érték el. Sikeres növényregenerációról számoltak be olyan kalluszk felhasználásával, amelyek antherából származtak, glumaeból, éretlen címerekből, levélalapból, mesocotyledonból, csíranövény szegmenteiből, érett embriókból. Az éretlen embrió eredetű kalluszk embriogénebbek és alkalmasabbak a növény regenerációra, mint más egyéb explantátumok.

Valamennyi növényi szövet, amely ezidáig került felhasználásra élő növényeket igényel, amelyek felneveléséhez helyre és időre van szükség. A növényregeneráció meghatározásáért felelős lehetséges genetikai mechanizmust tanulmányozták a kukoricánál. Arra a következtetésre jutottak, hogy éretlen embrió eredetű kalluszk regenerációját néhány nukleáris gén v. géncsoport befolyásolta. Az 1-es és 2-es típusú kallusz képződésére vonatkozóan a genotípusos variációk igen nagy részaránya a kukoricánál additív genetikai varianciának tudható be, míg a heterózis pozitívan növelte a válaszreakciót. Szignifikáns anyai hatást jeleztek a B-73-ra vonatkozóan, nem tapasztaltak ilyen hatást Lancaster típusú vonalakra. Az érett embriókból származó kallusz növekedést indukált LS táptalajon, amelyet főképpen additív génhatások kontrolláltak (általános kombinálódó képesség. Az additív génhatások sokkal fontosabbak, mint a dominánsok a szomatikus embriogenezis %-ára és az embrióként regenerált növények arányára, amikor a generációs átlagot analizálták. A citoplazmás anyai és/vagy apai hatások szignifikánsak voltak a szomatikus embriók frekvenciájára, hasonlóképpen az embrióként regenerált növények számára és gyakoriságára. A genetikai varianciák arra utaltak, hogy legalább egy gén vagy a gének egy csoportja határozza meg a szomatikus embriogenezis gyakoriságának expresszióját.

A kukorica regenerációja sejt- és szövetkultúrákból néhány specifikus genotípusra és táptalaj kombinációra vonatkozott. A táptalajra vonatkozó fejlesztés

általános előrehaladást hozott, azonban a genotípusos differenciák továbbra is megmaradtak. A genotípus komponensre vonatkozó tanulmányok felhasználhatók a válaszreakció szintjének előrejelzésre és sokkal részletesebben jellemezhető a szövetkultúrák reakciójának természete is.

Az egyre gyakrabban jelentkező aszályos évjáratok nagy károkat okoznak a szántóföldi és kertészeti növénykultúrákban, így egyre inkább jelentős mértékű terméseszkkenéssel számolhatunk a mezőgazdasági termesztés során. A növények szárazságtűrését nagyon nehéz megbízhatóan csak szántóföldi vizsgálatok alapján elemezni. A szárazságtűrés tanulmányozása és a vízhiányhoz történő adaptációs folyamatok tisztázása csak jól kontrollálható és megismételhető mesterséges körülmények között lehetséges.

A szárazságtűrés genetikai és élettani alapjainak tanulmányozására *in vitro* (sejt- és szövetkultúra) rendszerek létrehozására van szükség, mivel ozmoregulációra az *in vitro* szövet- és sejtkultúrák is képesek. A szárazságtűrés szempontjából fontos fiziológiai jellegek közül döntő fontosságú tulajdonság, az ozmoreguláció sejtszinten is tanulmányozható. Ez a mechanizmus megakadályozza a sejtek és szövetek kiszáradását vízhiány esetén. Az ozmoreguláció a citoplazma védekező reakciója, amely sóstressz és a vízhiány okozta ozmotikus stressz hatására indukálódott biokémiai folyamatok eredményeként jön létre. E folyamat során szerves ionok, oldható cukrok és egyéb kismolekulájú szerves molekulák halmozódnak fel, csökkentve a sejtnedv ozmotikus potenciálját, azaz a vízpotenciált, ami megakadályozza a sejtek vízvesztését. A növények ozmoregulációja a genotípustól függ.

A kukoricanemesítés egyetlen perspektívája a hibridnemesítés. A heterózisnemesítés alapja, hogy a kiinduló szülői vonalak genetikailag eltérő származásúak legyenek. A megfelelő hibridkombinációk előállításához, a nemesítői munka megtervezéséhez elengedhetetlen tisztázni a beltenyésztett vonalak közötti genetikai rokonság mértékét.

A genetikai különbség megállapítására a morfológiai – DUS bélyegek – vizsgálati módszerek mellett a molekuláris genetikai markerek alkalmazása is segítséget nyújthat. A morfológiai jellemzők használata nagyon korlátozott, hiszen nagyban befolyásolhatják a genetikai kapcsolat érvényre jutását a környezeti tényezők, így a genetikai távolság becslését bizonytalanná teszik. A DUS–vizsgálatok eredményeként kapott fajtaleírások segítségével a leghasonlóbb fajta meghatározása illetve a hasonlósági csoportok vizsgálata is lehetségessé válik.

A kukoricanemesítésben használatos molekuláris markerezésre alapozott azonosítási technikák (izoenzim, RFLP, RAPD, stb.) döntően a nemesítési alapanyagbázis (gene stock) genetikai változékonyságának tanulmányozását teszik lehetővé, továbbá a heterózis mértékének előrejelzését, fajtavédelmi kérdések tisztázását segíthetik elő. Az utóbbi néhány évtizedben a kukoricanemesítés szűk genetikai bázisra épült, mely magában hordozza a genetikai diverzitás csökkenésének a veszélyét és korlátozhatja a genetikailag eltérő szülők közötti keresztezés lehetőségét. Ez a múltban, de napjainkban is számos problémát vethet fel, elsősorban a hibrid betegségekkel szembeni esetleges ellenállóképességének csökkenésén túl az alkalmazkodóképesség romlását is. A genetikai változékonyság növelésének egyik hatékony módszere a kukoricánál az indukált mutáció alkalmazása. Az indukált mutáció jelentős szerepet játszik a biodiverzitás növelésében, hiszen nagyszámú mutáns kukoricavonalat használnak fel különböző nemesítési célból a világ számos országában.

A mutációs azonosítási és nemesítési technikákban elterjedten használják a PCR– (*Polymerase Chain Reactions*) alapú eljárásokat. Molekuláris markerekkel a genotípusok közvetlen összehasonlíthatóvá válnak DNS szinten. A DNS szinten történő genetikai változékonyság becslését már hosszú ideje használják a kukoricanemesítési kutatásokban. Több tanulmány készült az RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) alkalmazásáról a kukoricában. Az RFLP technikával nagyszámú polimorfikus lokuszt lehetett kimutatni a vizsgálatok során, de néhány hátránya miatt az alternatív marker rendszerekre alapozott PCR technikák irányába

fordultak a kutatások. Ilyen PCR technika az AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*). Az AFLP technika a teljesen emésztett genomikus DNS restrikciós fragmentumok szelektív PCR felerősítésén alapszik. Az AFLP markerek magas reprodukálhatóságot mutatnak, ellentétben az RAPD markereivel. Az RFLP–vel szemben az AFLP nagy előnye az, hogy olyan kapcsoltsági csoportok, amelyek azonosítása nem lehetséges az RFLP–vel, kimutatható az AFLP technikával, különösen a telomer környéki régióban, ami korábban szinte teljesen mentes volt detektálható markerektől. Nagy előnye az AFLP módszernek, hogy egyetlen PCR reakció jelentős polimorfizmus detektálását teszi lehetővé bármilyen DNS szekvencia előzetes ismerete nélkül.

Az AFLP előnyös tulajdonsága, hogy kivitelezéséhez nincs szükség előzetes szekvencia információkra, ezenkívül a reakciók eredményeként kapott komplex sávmintázatokban közeli rokon genotípusok esetén is viszonylag nagy valószínűséggel találhatók több lókuszra nézve polimorfikus fragmentumok. AFLP markereket alkalmaztak kukoricában a genetikai távolság és a hibridek teljesítőképességének összehasonlító vizsgálatánál és beltenyésztett kukoricavonalak genetikai hasonlóságának összehasonlító elemzésénél.

A párosítási modellek közül a diallél keresztezést alkalmazzák a legáltalánosabban, mivel ezzel nyerhető a vizsgált genotípusokról a legteljesebb körű genetikai információ. Lényege a beltenyésztett törzsek genetikai értékének keresztezéseikben megmutatkozó teljesítőképességük alapján történő elbírálása, az N számú szülőtől származó összes lehetséges keresztezési kombináció alapján létrejött N^2 tagból álló anyagot, mint pánmixissel létrejött populáció elemezve.

9. Felhasznált és ajánlott irodalom

Abel, C. A., Berhová, M. A., Wilson, R. L., Binder, B. F., Hibbard, B. E. (2000): Evaluation of conventional resistance to European corn borer (*Lepidoptera: Crambidae*) and Western corn rootworm (*Coleoptera: Chrysomelidae*) in experimental maize lines developed from a backcross breeding program. *Journal of Economic Entomology*, 93 (6): 1814–1821.

- Ágoston, T., Pepó, P. (2005): Évjáráthatás vizsgálata őszi búzafajták termésére és termésbiztonságára. Agrártudományi Közlemények, Acta Agraria Debreceniensis, 16: 62–67.
- Altinbas, M. (1996): A study on the effectiveness of some statistic genetic parameters in predicting hybrid performances for grain yield and its components in maize. Anadolu, 6.1: 32–44.
- Anderson, J. A., Matthiesen L., J. Hegstad, J. (2004): Resistance to an Imidazolinone Herbicide is Conferred by Gene on Chromosome 6DL in the Wheat Line cv. 9804. Weed Science Vol. 52: 83–90.
- Bača, F. J., Jovanovič, V.Z., Kaitovič, Z. Z., Jasmin, J., Ripka, G., Hatala Zsellér, I. (2002): Effects of different growing systems on attractiveness of maize crop to beetles of *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte. 9th IWGO Diabrotica Subgroup Meeting and 8th EPPO ad hoc Panel. Book of Abstracts: 67–68.
- Baezinger, P. S., Shelton, D. R., Shipman, M. J., Graybosch, R. A. (2001): Breeding for end–use quality. Reflections on the Nebraska experience. Z. Bedő and L. Láng (eds.). Wheat in a Global Environment: 255–261. Kluwer Academic Publishers. Printed in Netherlands.
- Bánfalvi Zs., Kondrák M. (2005): Hosszan tárolható paradicsom. Zöld Biotechnológia, 2: 2–5. p
- Barabás, Z., Matuz, J., Kertész, Z. (1987): A búza nemesítése. In: A búzatermesztés kézikönyve. (szerk. Barabás, Z.). Mezőgazdasági Kiadó, Budapest: 117–142.
- Barabás, Z., Matuz, J., Mesterházy Á. (1980): Versuchsmethoden zur Untersuchung der Horizontalen Resistenz und Einige Probleme der Auslese. Bericht über die Arbeitstagung 1980. der Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtleiter in Gumpeinstein vom 25. bis 27. November: 131–133.
- Bartos, A. (1991): A kukorica néhány ökológiai és beltartalmi értékének elemzése többváltozós matematikai módszerrel. Növénytermelés, Tom. 40: 353–363.
- Bedő, Z., Láng, L., Juhász, A., Rakszegi, M. (2001): Kemény endospermium szerkezetű, jó malom– és sütőipari minőségű búza kutatása Martonvásáron. In: A jó minőségű, keményszemű búza nemesítése és termesztése. Szerk. Bedő Z. *et al.* Martonvásár–Nádudvar–Szeged: 35–56.
- Benavidez, R., Jasa, P. (1993): Evaluation of additive and non–additive effects in maize (*Zea mays* L.) populations. Informe–Tecnico–Estacion–Experimental–Agropecuaria–Pergamino, No. 284.: 12–22.
- Berzsenyi, Z., Lap, D. Q. (2003): A N–műtrágyázás hatása a kukorica– (*Zea mays* L.) hibridek szemtermésére és N–műtrágyareakciójára tartamkísérletben. Növénytermelés, 52: 389–408.
- Biesaga, Koscielniak J., Marcinska I., Wedzony, M., Koscielniak, J. (2003): Effect of zearalenone treatment on the production of wheat haploids via the maize pollination system. Plant Cell Reports, 21 (11): 1035–1039.

- Bjornstad, A., Opsahl, H. G., Aasmo, M. (1988): Effect of donor plant environment and light during incubation on anther cultures of some spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 17: 27–37.
- Bódi, Z., Tóth, Sz. (2005): Importance of genetic diversity in sustainable maize breeding. *Sustainable Agriculture Across Borders in Europe*, Debrecen–Oradea: 119–121.
- Bódis L., Heszky L., Matók Gy. (2004): Géntechnológia és termézbiztonság. OMMI. Budapest.
- Bóna, L., Matuz, J., Ács, E. (2003): Correlation between screening methods and technological quality characteristics in bread wheat. *Cereal Research Communications*, 31: 201–202.
- Buhiniček, I. (1994): Quantitative analysis of callogenesis in immature and mature maize (*Zea mays* L.) embryos culture *in vitro*. *Poljoprivredna znanstvena smotra*, Vol.59.4: 155–169.
- Buhiniček, I., Pavlina, R., Šutina, R., Vasilj, D., Rojc, M. (1994): Comparison of *in vitro* calli weight gain and grain yield of some maize lines. *Poljopr. Aktualnosti*, Vol. 30.3–4: 277–282.
- Buhiniček, I., Vasilj, D., Pavlina, R., Šutina, R., Palaveršič, B. (1994): Estimates of GCA and SCA for maize lines and hybrids *in vitro* and *in situ* based on Griffing's methods 2 and 4. *Poljop. znan. Smotra*, Vol. 59.4: 357–367.
- Burow, D. M., Coors, G. J. (1993): DIALLEL Analysis and Simulation. User' s Guide. Department of Botany, Louisiana State University. Department of Agronomy, University of Wisconsin: 31.
- Chu, C. C., Hill, R. D. (1988): An improved anther culture method for obtaining higher frequency of embryoids in *Triticum aestivum* L. *Plant Sci.*, 55: 175–181.
- Csanádi, E. (2004): Magnézium–nemcsak kérődzőknek. *Kemira GrowHow.*, IV. évf. 4.: 15–16.
- Csathó, P. (1994): A környezet nehézfém szennyezettsége és az agrártermelés. MTA. TAKI. Budapest.
- Csontos, Gy., Nemeskéri, E., Pepó, Pá, Pepó, Pé. (1993): A biológiai, ökológiai és termelési tényezők közötti kölcsönhatás és a minőség, *DATE 125. Anniversary*: 239–242.
- Csősz, L.–né, Mesterházy, Á., Purnhauser, L., Tar, M. (2004): Rozsdabetegségek. In: *A nyolcadik évtizedben...* Szerk.: Sági, F. Gabonatermesztési KHT, Szeged, Agroinform Kiadó: 98–100.
- Darkó, É. H., Ambrus, É., Stefanovits, Bányai, J., Fodor, F., Bakos, Barnabás, B. (2004.): Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al–sensitive wheat genotype and in Al–tolerant lines developed by *in vitro* microspore selection. *Plant Science*, 166 (3): 583–591.
- De Prado, R. A., Franco, A. R. (2004): Cross–Resistance and Herbicide Metabolism in Grass Weeds in Europe: Biochemical and Physiological Aspects. *Weed Science*, Vol. 52: 441–447.

- Dudits, D., Heszy, L. (2000): Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform Kiadó, ISBN 963 502 697 8, Budapest: 32–139.
- Duncan, R. D., Widholm, M. J. (2004): Osmotic induced stimulation of the reduction of the viability dye 2, 3, 5–triphenyltetrazolium chloride by maize roots and callus cultures. *J. Plant Physiol.*, 161: 398.
- Esen, A. (1987): A proposed nomenclature for alcohol–soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). *J. Cereal Sci.* 5:117–128.
- Fromm, M., Taylor, L.P., Walbot, V. (1985): Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *PNAS*, 82 17:5824–5828.
- Füzi, I. (2000): A vöröszrozsda kártételi jelentősége hazánkban. *Gyakorlati Agrofórum*, 11.5: 27–29.
- Gerashchenkov, G. A., Gorbunova, V. Y., Zarjanova, L. D., Rozhnova, N. A., Vakhitov, V. A. (2000): RAPD–PCR analysis of genome variability in spring common wheat cultivars and their androclinal double haploid forms. *Russian Journal of Genetics*, 36 (8): 895–900.
- Green, C. E., Philips, R. L. (1975): Plant regeneration from tissue culture of maize. *Crop. Sci.* 15: 417–421.
- Gressel, J. (2002): *Molecular biology of weed control*. New York: Taylor & Frances: 155–160; 262–266.
- Griffing, B. (1956): Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian Journal of Biological Sciences* 9: 463–493
- Guang Yuan, H., Korbuly, E., Barnabás, B. (1993): High frequency callus formation and regeneration of fertile plants from haploid cell suspension derived from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, 90 (1): 81–87.
- Győri, Z., Győriné Mile, I. (1998): *A búza minősége és minősítése*. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest: 46–58.
- Győri, Z., Lányi, A., Ruzsányi, L., Kovács, B., Loch, J. (1993): Effects of fertilization, irrigation and crop rotation on the transition and toxic element uptake of corn. *The Science of the Total Environment, Supplement 1993*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam: 367–380.
- Győri, Z., Nagy, J., Kovács, B., Orosz, É., Bodnár, E., Lányi, A. (1993): Element uptake and circulation tests in corn. *Mésogée*, 1993. Vol. 53: 55–60.
- Győri, Z., Ruzsányi, L., Kovács, B., Lányi, A., Zsupos Oláh, Á. (1992): The effect of different factors on the element uptake by corn. *Pollution and Hydrology of Surface and Groundwater Agricultural Amelioration Selected Reports, Volume XXIV–XXV.*: 266–280.
- Hajósne Novák, M. (1999): *A genetikai variabilitás a növénynevelésben, Molekuláris diagnosztika*. Mezőgazda Kiadó Kft. Budapest

- Hatala Zsellér, J., Széll, E. (2003): Comparison of the effect of soil treatment and crop rotation on Western Corn Rootworm. Ecology and Management of Western Corn rootworm. Int. Symposium, Göttingen: 34.
- Hataláné Zsellér, I., Széll, E., Vörös, G., Ripka, G. (2000): Az amerikai kukoricabogár elleni védekezés hazai tapasztalatai. Integrált termesztés a kertészeti és szántóföldi kultúrákban. XXI. Budapest: 33–43.
- Heap, I. (2004): The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. www.weedscience.com
- Heap, I., Knight, R. (1982): A population of ryegrass tolerant to the herbicide diclofop-methyl. Journal of Australian Institute of Agricultural Sciences, Vol. 48: 156–157.
- Heszky L., Fésüs L., Hornok L. (2005): Mezőgazdasági biotechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest.
- Heszky, L., Galli, Zs. (2006): Genetika, egyetemi jegyzet, SZIE, Gödöllő.
- Hoffmann, B. (2003): Genetika alapfogalmak, Veszprémi Egyetem Georgikon MTK, Keszthely. Internet: www.georgikon.hu/tanszekek/Novtud/alapfog.htm
- Holt, J. S., Lebaron, H. M. (1990): Significance and distribution of herbicide resistance. Weed Technology, Vol. 4: 141–149.
- Kádár, A. (2001): Vegyszeres gyomirtás és termésszabályozás. Factum Bt., Budapest. 375.
- Keszthelyi, S., Najat, A., Fekete, A., Marczali, Zs. (2002): A kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis* Hübner) lárvák növényenkénti számának és elhelyezkedésének hatása egy középérésű kukoricahibrid súly- és beltartalmi értékeire. Növényvédelem, 38.7: 337–345.
- Kiss, E. (1999): Növényi molekuláris genetika I. (egyetemi jegyzet) GATE Gödöllő.
- Kiss, J., Khosbayan, J. Komáromi, J., Jgrc, Barčič, R., Dobrinčič, J., Sivcev, C.R., Edwards, J., Hatala Zsellér (2001): Is the Western Corn Rootworm adapting itself to the European crop rotation system? Results of a Joint European Trial. XXI. IWGO Conference VIII. Diabrotica Subgroup Meeting, Legnaro–Padua–Venice, Italy Abstracts: 6.
- Láng, L. (2006): A diverzitás mértéke és értékelése a búzatermesztésben és a nemesítésben. MTA Doktori disszertáció értekezései, Budapest.
- Lelley Eder, C. T., Gransgraber, H. (2004): Influence of 1BL.1RS wheat–rye chromosome translocation on genotype by environment interaction. Journal of Cereal Science, 39.3: 313–320.
- Liu, W., Zheng, M., Pelle, E., Konzak, C. (2002): Highly efficient double–haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. Crop Science, 42 (3): 686–692.
- Loch, J., Nosticzius, Á. (2004a): A mangán felvétele és szerepe. Agrokémia és Növényvédelmi Kémia. Mezőgazda Kiadó. Budapest.

- Melo, W. M. C., Pinho, R. G., Ferreira, D. F. (2001): Combining ability and genetic divergence in commercial maize hybrids. *Ciencia e Agrotechnologia*, 25: 821–830.
- Mohay, J. (1986): Diallél keresztezési rendszer. *Genetika Kislexikon*. Natura Kiadó, Budapest: 40.
- Nagy, I. (1999): Továbbfejlesztett PCR-alapú polimorfizmus-vizsgálati technikák. *Növénytermelés*, 48:421–434.
- Navabi, A., Singh, R. P., Tewari, J. P., Briggs, K. G. (2003): Genetic analysis of adult-plant resistance to leaf rust in five spring wheat genotypes. *Plant Disease*, 87 (12): 1522–1529.
- Neszmélyi A. (1997): Kukoricahibridek identifikálás a „PAGE”-módszer alkalmazásával. Diplomadolgozat DATE, Debrecen. 1–50.
- Pauk J., Kertész Z., Beke B., Bóna L., Csősz M. Matuz J. (1995): New winter-wheat variety – GK-Délibáb developed via combining conventional breeding and in vitro androgenesis. *Cereal Research Communications* 23 (3): 251–256.
- Pepó, P. (1985): *Agrogenetika gyakorlatok*, DE ATC MTK, Debrecen
- Pepó, P. (1995): Genetic improvement for sustainable maize (*Zea mays* L.) production in Hungary. *Int. Conf. on Sustainable Agriculture*, Hisar, India: 114–122.
- Pepó, P. (2005): A dihaploid (DH) előállítás hatékonyságának javítása búzánál (*Triticum aestivum* L.). *Növénytermelés*, 54.1–2: 3–12.
- Piljac V., Piljac G., Maricic P. (1986): Electrofocusing in polyacrylamide or agarose gels containing ampholine carrier ampholytes, In: *Genetic engineering, Centrifugation and electrophoresis*. 73–111.
- Ryan, G. F. (1970): Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Science*, Vol. 18.: 614–616.
- Sárdi, K. (2003): A növénytáplálás alapjai. *Agrokémia*. Veszprémi Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, Keszthely: 69.
- Smith J. S. C., Smith O. S. (1988): Comparisons of zein profiles from inbred F₁ and F₂ generations of maize as revealed by reversed phase high-performance chromatography. *Theoretical Applied Genetics*. 76:244–252.
- Szabó, S. A., Győri, D., Regiusné Mőcsei, Á. (1993): *Mikroelemek a mezőgazdaságban. Stimulatív mikroelemek*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Toldiné Tóth, É., Gyulavári, O. (2004): Kórtani kutatások. In: *A nyolcadik évtizedben...Szerk.: Sági, F. Gabonatermesztési KHT*. Szeged: 183–186.
- Torne, J. M., Santos, M. A., Pons, A., Blanco, M. (1980): Regeneration of plants from mesocotyl tissue cultures of immature embryos of *Zea mays* L. *Plant Sci. Lett.*, 17: 339–344.
- Tóth, K., Tőkei, K. M., Kertész, Z., Pauk, J., Heszky, L. (1997): Agronomic performance of doubled haploid wheat varieties. *Cereal Research Communications*, 25 (2):155–161.

- Tóth, Sz., Pepó, Pá. (2003): Nemesítési alapanyagok vizsgálata kukoricában. *Növénytermelés*, Tom. 52. No. 6.: 613–614.
- Turesson, S., Ljunberg, A., Johansson, N., Karlsson, K. E., Suijs, L. W., Josset, J. P. (2000): Large-scale production of wheat and triticale double haploids through the use of a single-anther culture method. *Plant Breeding*, 119 (6): 455–459.
- Tyagi, A. K., Rashid, A., Maheshwari, C. (1979): High frequency production of embryo in *Datura innoxia* from isolated pollen grains by combined cold treatment and serial culture of anthers in liquid medium. *Protoplasma*, 99: 11–17.
- Urias-Lopez, M., Meinke, L. J., Higley, L. G., Haile, F. J. (2000): Influence of western corn rootworm (*Coleoptera: Crhrysomelidae*) larval injury on photosynthetic rate and vegetative growth on different types of maize. *Environmental Entomology*, 29 (5): 861–867.
- Veress, Z., Lázár, L. (1997): A DUS-vizsgálatokban szereplő tulajdonság típusok vizsgálata a megkülönböztethetőség százalék módszerével kukorica (*Zea mays* L.) DUS-adatokkal. *Növénytermelés*. 46:401–411. p.
- Veress, Z., Matók, GY. (1999): Hasonlósági csoportok a DUS-fajtaleírások alapján *Növénytermelés*. 48:43–53. p.
- Vida, Gy., Láng, L., Bedő, Z. (1996): Őszi búzák alveográfus és más sütőpari minőségi tulajdonságai közötti összefüggések elemzése főkomponens analízissel. *Növénytermelés*, 45: 435–443.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407–4414.
- Willman, M. R., Schroll, S. M., Hodges, T. K. (1985): Inheritance of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from primary (Type 1) callus in maize. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 25: 95–100.
- Wilson C. M., Sprague G. F., Nelsen T. C. (1989): Linkages among zein genes determined by isoelectric focusing. *Theoretical Applied Genetics* 77:217–226.
- Wilson, M. C. (1985): Nomenclature for zein polypeptides based on isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.– *Cereal Chem.* 62:361–365.
- Zamani, I., Kovács, G., Gouli, E., Vavdinoudi Roupakias, D. G., Barnabás, B. (2000): Regeneration of fertile double haploid plants from colchicine-supplemented media in wheat anther culture. *Plant Breeding*, 119 (6): 461–465.
- Zhou, H. (1990): Influence of the physical condition of induction media on the culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) anthers. M. S. Thesis. Washington State Univ., Pullman.
- Zhou, H., Konzak, C. F. (1989): Improvement of anther culture methods for haploid production in wheat *T. aestivum* L.). *Crop Sci.*, 29: 817–821.

Zubor A., Surányi Gy., Prokisch J., Győri Z., Borbély Gy. (2003): AFLP módszer alkalmazása növényi minták azonosításához. Acta Agraria Debreceniensis, 10:207–213.

<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/44/executivesummary/pdf/Brief%2044%20-%20Executive%20Summary%20-%20English.pdf>

10. Melléklet

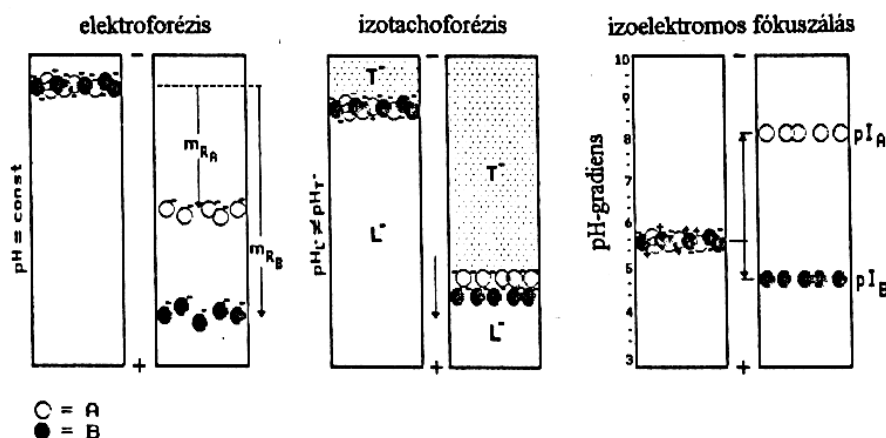
Az izoelektromos fókuszálás módszer az (MgSzH metodika szerint)

Izoelektromos fókuszálás (IEF)

Az elektroforézist az anódtól a katódig növekvő pH gradiensen végezzük.

Az elválasztandó fehérjék az elektromos áram hatására az izoelektromos pontjuknak megfelelő pH értéknél összegyűlnek, fókuszálódnak. (A fehérjemolekula elektroforetikus mozgékonyága az izoelektromos pontnál nulla, mivel itt már nem rendelkeznek töltéssel, az elektromos mező már nem gyakorol hatást rájuk.)

A pH gradiens előállítását különböző poliamino- és polikarbonsavak keveréke, az amfolit készítmény teszi lehetővé. Ahhoz, hogy a fehérjéket elektrofókuszálással elválasszuk, stabil és lineáris pH gradiensre van szükség (PILJAC et al., 1986). 1966-ban Westenbergnek és Svensonnak sikerült szintetizálni a szükséges carrier amfolitokat.



19. ábra. Három elektroforetikus elválasztás elve

Oldatok

1. Extraháló oldat

2-Chlorethanol 30 %

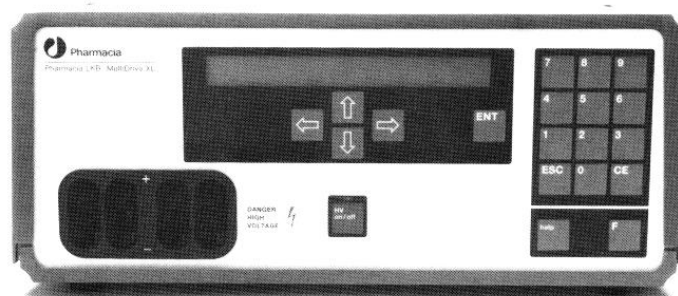
2. Gél törzsoldat

- | | |
|---------|----------------|
| 16,57 g | akrilamid |
| 0,43 g | bisz-akrilamid |
| 250 ml | deszt.víz |
- tárolás 4 °C-on
3. APS oldat (20%-os)
- | | |
|-------|---------------------|
| 2,0 g | ammónium perszulfát |
| 10 ml | deszt.víz |
- tárolás 4 °C-on
4. Anód puffer
- | | |
|--------|-----------------|
| 0,83 g | L-aszparaginsav |
| 0,92 g | L-glutaminsav |
| 250 ml | deszt.víz |
- tárolás 4 °C-on
5. Katód puffer
- | | |
|--------|--------------|
| 0,83 g | L-arginin |
| 0,92 g | DL-lizin |
| 30 ml | etiléndiamin |
| 250 ml | deszt.víz |
- tárolás 4 °C-on
6. Fixáló oldat
- 12%-os triklór-ecetsav (TCA)
7. Festőoldat
- | | |
|---------|--------------------------------|
| 0,3 g | Coomassie Brilliant Blue R 250 |
| 0,9 g | Coomassie Brilliant Blue G250 |
| 220 ml | ecetsav |
| 360 ml | metanol |
| 2000 ml | deszt.víz |

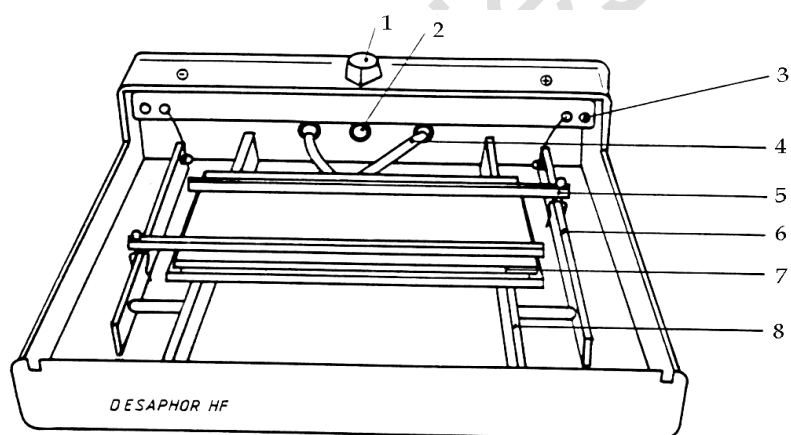
ESZKÖZÖK

Készülékek

Tápegység: 0,5–400mA, 10–3500V, 1–200W



20. ábra. Tápegység



21. ábra. Futtatókamra

1. Főkapcsoló
2. Gázkivezető
3. Csatlakozás a tetőhöz
4. Hűtőcső
5. Elektroárusító
6. Elektroda sín
7. Hűtőlap
8. Hűtőlap tartója

Izoelektromos fókuszálás ultravékony gélen (UTIL–IEF)

Az alkoholban oldódó fehérjéket szemenként vonjuk ki a magokból és ultravékony poliakrilamid gélen választjuk el izoelektromos fókuszálással. A gélen található fehérjesávok mintázata jellemző egy–egy hibridre vagy beltenyésztett vonalra. Vagyis található egy vagy több olyan sáv az apai szülőben, amely az anyai szülőnél hiányzik, viszont a hibridben szintén jelen van. Ezek a sávok használhatók markersávként a hibridek azonosításánál.

Fehérje extrakció

A vizsgálandó száraz magvakat egyenként darafinomságúra őröljük. Körülbelül 100 g őrleményhez 0,2 ml 30%-os chlorethanol extraháló oldatot adunk (ez növényfajonként más és más lehet). A mintát szobahőmérsékleten (20°C), sötétben állni hagyjuk egy órán keresztül. Majd 30 másodpercig ultrahangfürdőben homogenizáljuk. Ezután centrifugáljuk 2000-es fordulatszámon (2000 x g), és a tiszta felülúszó folyadékot használjuk az elektroforézisre.

Gélkészítés

A még folyékony halmazállapotú gélt két üveglap közé, stabil vivőfóliára öntjük. A kívánt gélvastagságot (0,12 mm) parafilmből készített távtartó biztosítja.

Gél-alapoldat pH 2–9 futtatáshoz:

törzsoldat 50,00 ml

urea 16,00 g

amfolit

pH 2–4 0,55 ml

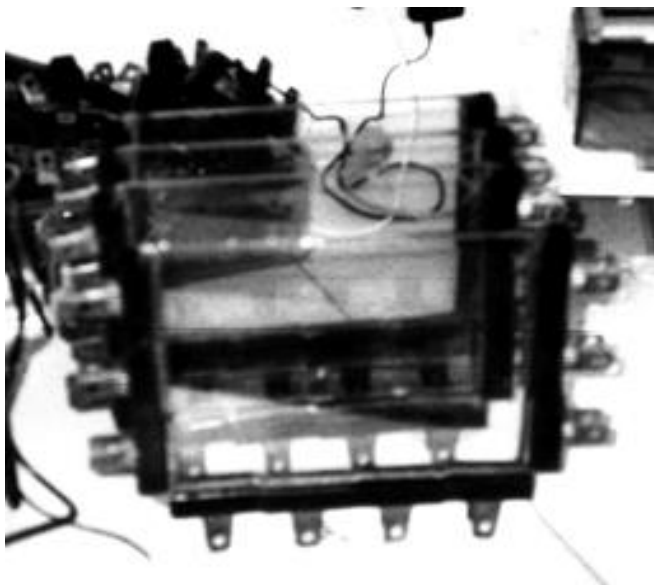
pH 4–6 0,55 ml

pH 5–8 1,40 ml

pH 4–9 1,90 ml

APS (20%) 350 µl

TEMED 50 µl



22. ábra. A megöntött gél

Ez a mennyiség tíz darab, 240 x 180 x 0,12 mm méretű gélhez elegendő, egy-egy gélhez 6,5 ml oldatot felhasználva. A megöntött gélek polimerizációs ideje legalább 45 perc szobahőmérsékleten, ezután közvetlenül felhasználható, vagy becsomagolva hűtőszekrényben két hétig tárolható.

Elektroforézis

A vivőfólián lévő polimerizálódott gélt a futtatókamra 5°C-ra hűtött kerámialapjára helyezzük, a jobb adhéziót és hűtést a fólia alá öntött vékony vízréteggel segítjük elő. Az elektródák alá a gélre helyezünk anód illetve katód oldattal átitatott szűrőpapírcsíkokat, duplafókuszálás esetén az anódokat a gél alsó és felső szélére, a katódot középre (ez növényfajonként más és más). A mintából a szükséges mennyiséget (6–25 µl) a mintafelvívő mélyedéseibe pipettázzuk.

Az elválasztást az 4. táblázat paraméterei szerint végezzük.

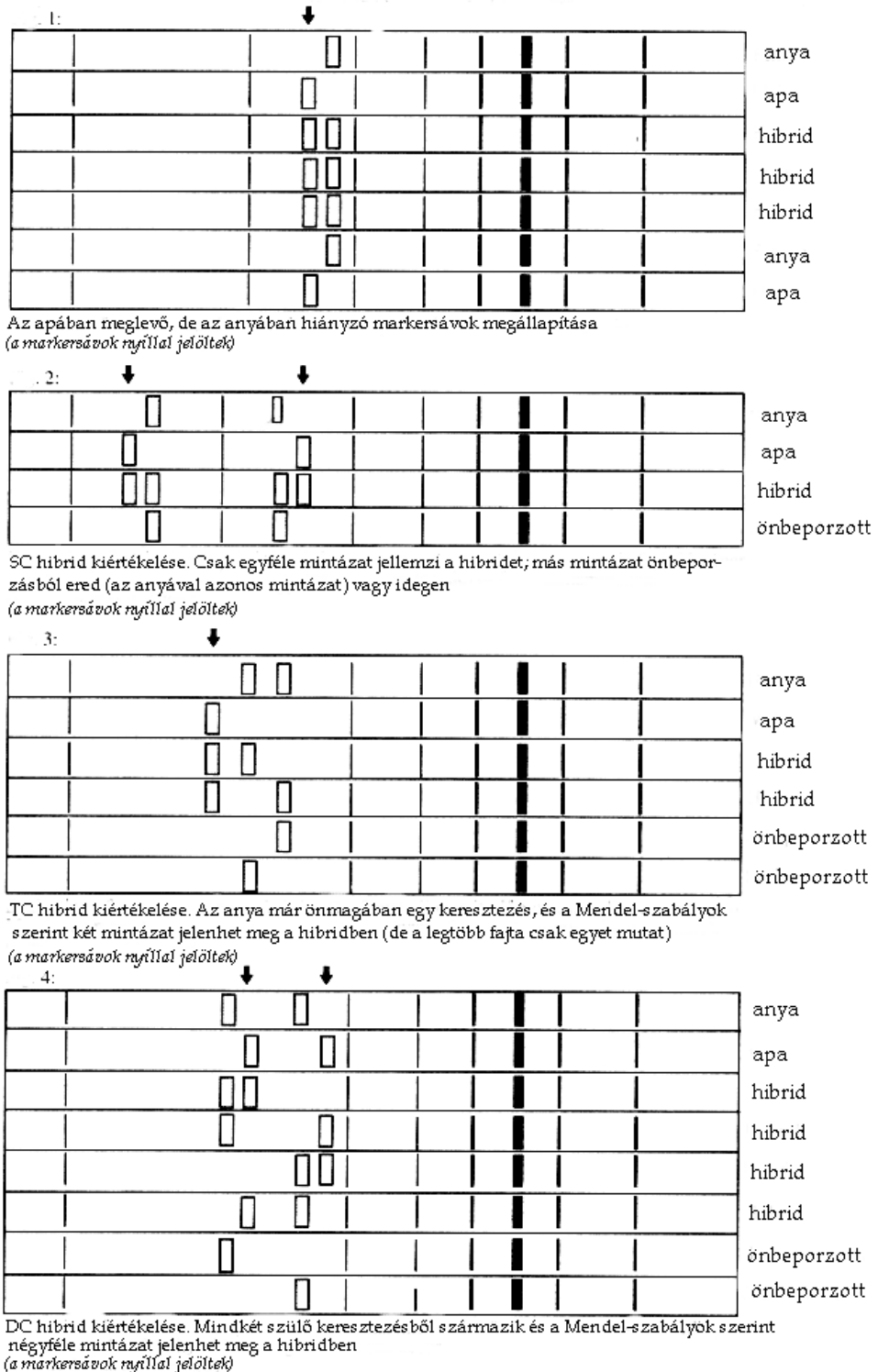
6. táblázat. Futtatási paraméterek 4 kamrára

Fázis	V	mA	W	perc
1	1000	50	5	10
2	1000	70	10	10
3	1000	80	30	10
4	1500	100	60	10
5	2000	120	90	10
6	2500	140	100	10
7	3000	150	110	10
levezető	1000	50	20	—

Fixálás és festés

A futtatás befejezése után a gél 12%-os TCA oldatban fixáljuk lassú rázással 25 percig, majd ennek leöntése után megfestjük. A festőoldatot 50 percig tartjuk a mintán, szintén lassú rázással. A felesleges festéket desztillált vizes öblítéssel eltávolítjuk, ezután szobahőmérsékleten szárítjuk a gél (kb.12 óra). Végül átlátszó öntapadós fóliával fedjük, így korlátlan ideig tárolható.

A különböző hibrid-típusok kiértékelése

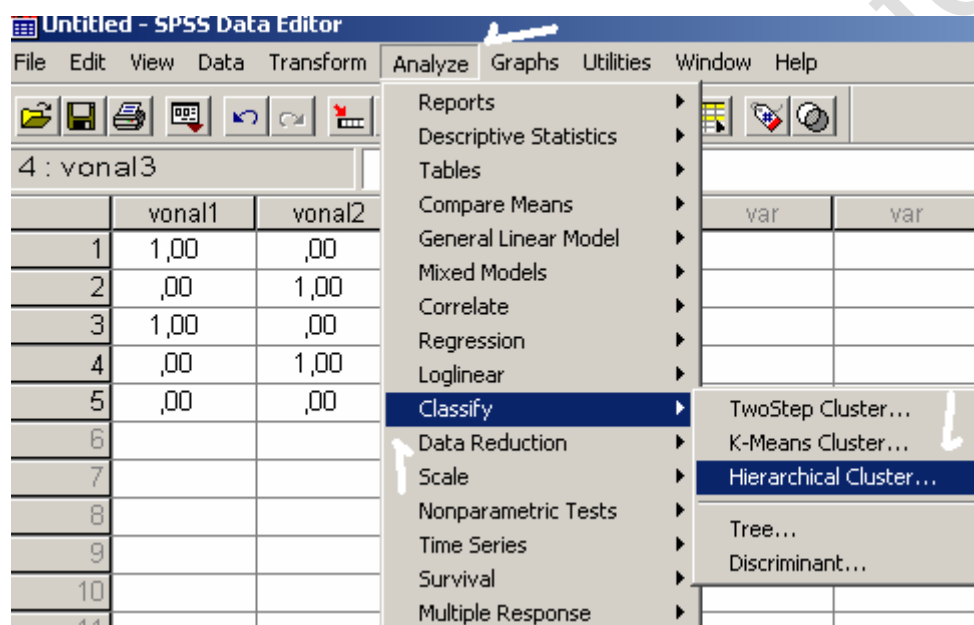


23. ábra. A genetikai tisztaság (hibrid tisztaság) meghatározásakor az anyai és az apai sávok fehérjemintázatát összehasonlítva hibridben egy vagy több markersávot kell találni, ezek jelenléte teszi lehetővé a kiértékelést.

Önbeporzáskor hiányoznak az apai markersávok, idegen beporzás esetén pedig a szülővonalak mintázatától eltérő sávok jelennek meg (23. ábra). Minél nagyobb a vizsgált szemek száma, annál kisebb a tévedés valószínűsége, minimálisan 100 szem bevizsgálása szükséges.

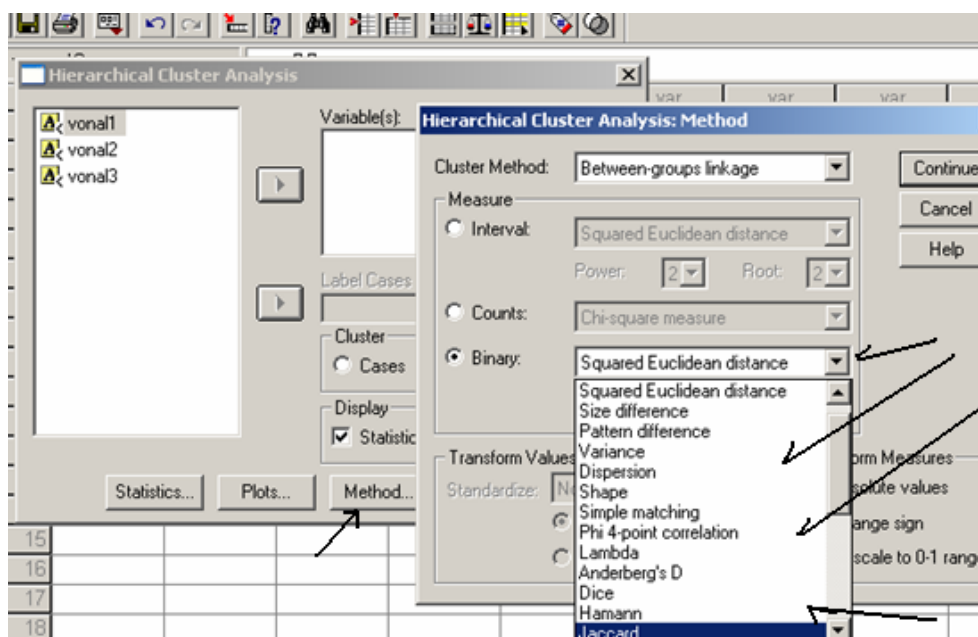
Statisztikai programcsomag használata (SPSS for Windows™)

Az adatok standardizálása, kódolása után a hallgatók számára is hozzáférhető statisztikai programcsomagok (jelen esetben az SPSS-el) segítségével a genetikai hasonlósági koefficiens egyszerűen ki lehet számolni. Az alábbi ábrákon az SPSS programcsomag szerinti lépést mutatjuk be (24. ábra).



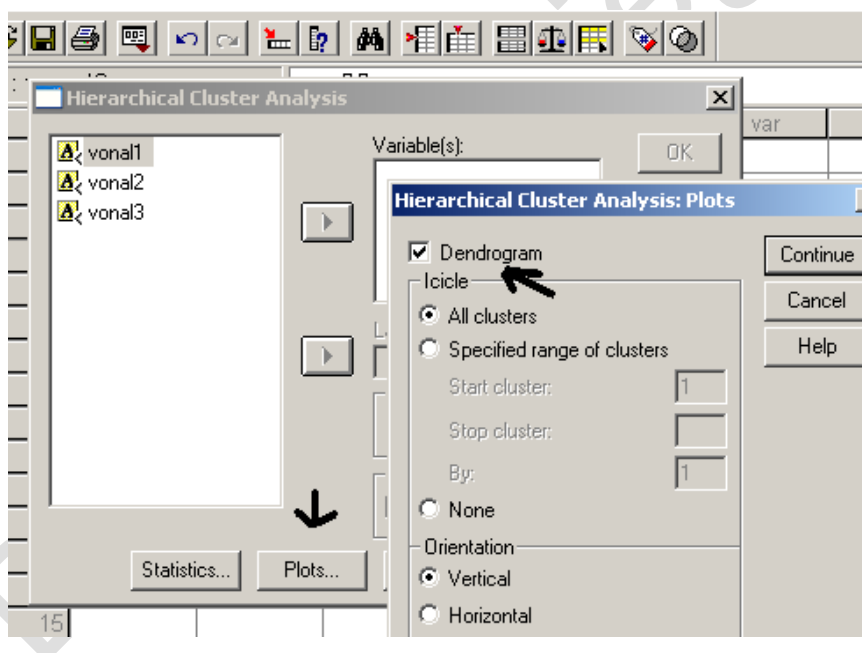
24. ábra. SPSS Data Editor

Jól látható, hogy többféle statisztikai elemzést el lehet végezni a kapott adatok, sávok értékeléséhez (25. ábra).



25. ábra. Klaszter analízis

A kapott adatokat jól szemléltethetjük dendrogram létrehozásával, melyet szintén a programcsomagon belül tudunk beállítani a 26. ábra alapján.



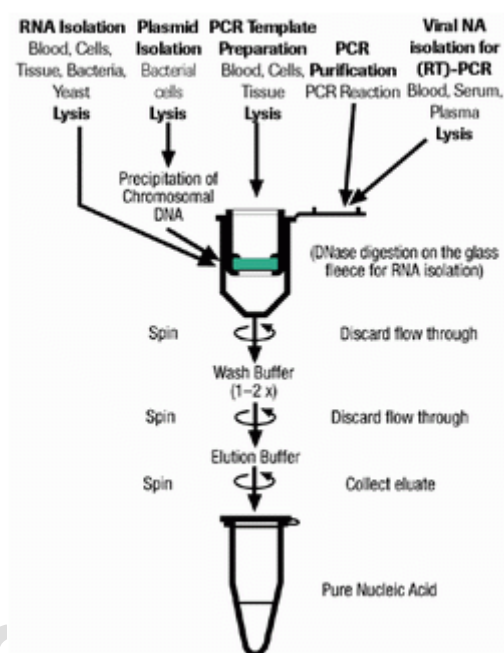
26. ábra. Klaszter analízis, Plot

DNS izolálás

Nagy tisztaságú DNS izolálás a molekuláris biológiai technikák alapvető lépése. A kereskedelemben többféle DNS kivonó kitteket használnak, melyet több erre szakosodott cég palettáján megtalálható (Bio-Science, stb.). A DNS tisztítás alapfolyamata három lépésből áll: a sejtek lízise, a szennyező fehérjék, RNS és egyéb

makromolekulák eltávolítása enzime és vagy kémiai módszerek segítségével majd további tisztítás és töményítés (27. ábra).

1. A növényi sejtek falának elroncsolása
2. A növényi sejtfal lízise kálium/SDS oldattal
3. A DNS kicsapása izopropanollal vagy megkötése gyantán/oszlopon
4. A DNS mosása etanoltartalmú oldattal.
5. A DNS elulálása a gyantáról/oszlopról vagy a csapadék összegyűjtése centrifugálással
6. A DNS oldása vízben vagy megfelelő pufferben.



27. ábra. DNS izolálás

(http://molbiol.roche.hu/t_nukleinsav.html nyomán)